

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-37190

(P2000-37190A)

(43) 公開日 平成12年2月8日 (2000.2.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 4
16/18		16/18	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19		C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
1/21		1/21	

審査請求 未請求 請求項の数42 F D (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-225228

(22) 出願日 平成10年7月23日 (1998.7.23)

(71) 出願人 000004569

日本たばこ産業株式会社

東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

(72) 発明者 西宇 淳

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日

本たばこ産業株式会社医薬探索研究所内

(72) 発明者 中村 祐輔

神奈川県横浜市青葉区あざみ野1-17-33

(72) 発明者 田中 敏博

東京都港区白金台4-4-8-401

(74) 代理人 100100217

弁理士 大東 輝雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物由来組織特異的生理活性タンパク

(57) 【要約】

【課題】 肥満及び/または肥満、特に内臓型肥満に伴う合併症（糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症、尿酸合成過剰に起因する高尿酸血症、睡眠時無呼吸症候群など）の発症に深く関与すると考えられている内臓に蓄積される脂肪組織、即ち内臓脂肪組織及び/または該組織の主要な構成細胞である脂肪細胞において有意な産生が見られるタンパク分子及び該タンパクをコードする遺伝子を同定し、該分子に特異的に作用する薬剤を提供することにより、該疾患の有効な治療及び予防を図る。

【解決手段】 ディファレンシャルディスプレイ法及びRT-PCR法を用いて、ヒト内臓脂肪組織での遺伝子の発現状態を、他の種々のヒト組織での遺伝子の発現状態と比較することにより、ヒト内臓脂肪組織で有意に発現が見られる遺伝子を同定し、上記のような種々疾患の発症及び進行、または抑制に関与する可能性を有するタンパク分子と同定した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクまたはその一部をコードするDNA。

【請求項2】 配列番号1に記載される塩基配列の塩基番号74乃至2170の塩基配列を含むDNA。

【請求項3】 配列番号1に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項4】 配列番号2に記載されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク、またはその一部。

【請求項5】 請求項1乃至請求項3のいずれかに記載のDNAを含む発現ベクター。

【請求項6】 請求項5に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

【請求項7】 請求項4に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有する抗体または抗体の一部。

【請求項8】 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項7に記載の抗体または抗体の一部。

【請求項9】 請求項4に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞。

【請求項10】 該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能力を有する非ヒト哺乳動物由来のB細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする請求項9に記載の細胞。

【請求項11】 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードするDNA若しくはその軽鎖をコードするDNAのいずれか一方のDNA、または両方のDNAが細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする請求項9に記載の細胞。

【請求項12】 請求項4に記載のタンパク若しくはその一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

【請求項13】 請求項7または請求項8に記載の抗体若しくは抗体の一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

【請求項14】 配列番号1に記載される塩基配列の塩基番号74乃至2170の塩基配列を含むDNAが、非ヒト哺乳動物の内在性遺伝子に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項15】 配列番号4に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクまたはその一部をコードするDNA。

【請求項16】 配列番号3に記載される塩基配列の塩基番号131乃至1221の塩基配列を含むDNA。

【請求項17】 配列番号3に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項18】 配列番号4に記載されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列

を有するタンパク、またはその一部。

【請求項19】 請求項15乃至請求項17のいずれかに記載のDNAを含む発現ベクター。

【請求項20】 請求項19に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

【請求項21】 請求項18に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有する抗体または抗体の一部。

【請求項22】 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項21に記載の抗体または抗体の一部。

【請求項23】 請求項18に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞。

【請求項24】 該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能力を有する非ヒト哺乳動物由来のB細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする請求項23に記載の細胞。

【請求項25】 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードするDNA若しくはその軽鎖をコードするDNAのいずれか一方のDNA、または両方のDNAが細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする請求項23に記載の細胞。

【請求項26】 請求項18に記載のタンパク若しくはその一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

【請求項27】 請求項21または請求項22に記載の抗体若しくは抗体の一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

【請求項28】 配列番号3に記載される塩基配列の塩基番号131乃至1221の塩基配列を含むDNAが、非ヒト哺乳動物の内在性遺伝子に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項29】 配列番号6に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクまたはその一部をコードするDNA。

【請求項30】 配列番号5に記載される塩基配列の塩基番号351乃至3180の塩基配列を含むDNA。

【請求項31】 配列番号5に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項32】 配列番号6に記載されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク、またはその一部。

【請求項33】 請求項29乃至請求項31のいずれかに記載のDNAを含む発現ベクター。

【請求項34】 請求項33に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

【請求項35】 請求項32に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有する抗体または抗体の一部。

【請求項36】 抗体が、モノクローナル抗体であるこ

とを特徴とする請求項35に記載の抗体または抗体の一部。

【請求項37】 請求項32に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞。

【請求項38】 該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能力を有する非ヒト哺乳動物由来のB細胞と哺乳動物由来のミエロマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする請求項37に記載の細胞。

【請求項39】 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードするDNA若しくはその軽鎖をコードするDNAのいずれか一方のDNA、または両方のDNAが細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする請求項37に記載の細胞。

【請求項40】 請求項32に記載のタンパク若しくはその一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

【請求項41】 請求項35または請求項36に記載の抗体若しくは抗体の一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

【請求項42】 配列番号5に記載される塩基配列の塩基番号351乃至3180の塩基配列を含むDNAが、非ヒト哺乳動物の内在性遺伝子に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、哺乳動物由来の新規生理活性タンパク若しくはその一部、該タンパク若しくはその一部をコードするDNA、該DNAを含む発現ベクター、該ベクターで形質転換された形質転換細胞、該タンパク若しくはその一部に反応性を有する抗体若しくはその一部、該抗体を産生する細胞、該タンパク若しくはその一部を含んでなる医薬組成物、該抗体若しくはその一部を含んでなる医薬組成物、及びトランスジェニック非ヒト哺乳動物に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒトをはじめとする哺乳動物は、生体が生命維持のために必要とする以上のエネルギーを摂取した場合には、該余剰のエネルギーを体内に貯蔵することによりある程度の期間の食物欠乏状態であれば克服できるような生命維持機構を備えている。このエネルギー貯蔵器官として最も重要な働きを担うのが脂肪組織であり、生命の維持には不可欠の組織である。ところが、現代の先進諸国のように食物にあふれ栄養過剰摂取状態においては、脂肪組織におけるエネルギーの過剰貯蔵状態が慢性的に起こることにより、いわゆる肥満と呼ばれる状態となる。

【0003】脂肪組織を構成する脂肪組織は、成熟した単胞性脂肪細胞からなり主として栄養（エネルギー）の

貯蔵を担う白色脂肪組織と、熱産生に関与する褐色脂肪組織に大別されるが、この白色脂肪細胞の容積と数の増加、即ち脂肪細胞の肥大と過形成が正常範囲以上になった状態がいわゆる肥満である。この単胞性脂肪細胞については、細胞質が一個の脂肪滴で占められ、核及び細胞内小器官は細胞の辺縁に押しやられた形態をとることから、脂肪滴を蓄えているだけの分化を完了し増殖能を失った静止細胞と考えられていたが、実際には脂肪分解と合成の平衡を保ちつつ常時活発な代謝を行い、細胞増殖能を有する細胞であることが明かにされている（Differentiation, Vol. 31, p. 42-49, 1986; J. Lipid Res., Vol. 1. 29, p. 1038-1045, 1987）。また近年の脂肪細胞の分子レベルでの研究により、脂肪細胞は、種々の生理活性タンパクを産生、分泌を行っていることも明らかになってきている（Science, Vol. 237, p. 405, 1987; 現代医療, Vol. 29, p. 985-992, 1996）。

【0004】一方、肥満は、単にその身体現象だけにとどまらず、同時に糖尿病、高脂血症、高血圧及び／または動脈硬化症などといった成人病あるいはcommon diseaseと総称される種々の疾患を併発することが一般的事実として認知されている。しかしながら、これまでのところ肥満の成因及び病態との関係に関する研究は、必ずしも十分であるとは言えず、例えば肥満と疾患との関連については、太れば生体に悪影響を及ぼし、節食して痩せれば改善するであろうという単純な量的側面で捉えられているのみであり、肥満と種々疾患との因果関係の解明にはほど遠いものであった。

【0005】ところが、ここ数年における肥満に対する科学的側面の研究から、肥満と病態との関連が、単に脂肪蓄積の量的な関与よりも、むしろ腹部内臓脂肪の蓄積（「内臓脂肪型肥満」とも呼ばれる）が肥満に伴う種々の合併症の併発に強く関与することが示唆されるようになったこと、また、1995年のフリードマン（Friedman）らによる脂肪細胞で発現される肥満遺伝子（ob遺伝子）とその産物としてのレプチン（leptin）の発見により、肥満と肥満に依存する種々病態の発症のメカニズムの研究は、脂肪細胞を生理活性物質の分泌臓器として捉え、特に内臓脂肪組織で有意に発現、産生される生理活性物質を分子レベルで同定、解明し、該分子と病態との関連性を解析するという方向に発展することとなった（Pharma Medica, Vol. 15, No. 9, p. 11-12, 1997）。

【0006】脂肪細胞から産生、分泌される生理活性物質は、アジポサイトカイン（adipocytokine）と総称されることもあり、これまでの研究から、脂肪細胞は、前述のob遺伝子の産物であり食欲の調節を担うレプチン（leptin）（Nature, Vol. 372, p. 425, 1994; Science, Vol. 269, p. 543-546, 1995）、脂肪組織局所の増殖の制御に関与するType-Iプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター（PAI-I）（Progress in Obesity Research, p. 197-200, 1995）、インスリン抵抗性に関与する腫瘍

壊死因子 α (TNF α) (Science, Vol. 259, p. 87-91, 1993) 及び補体因子Dであるアジプシン (adipsin) (J. Biol. Chem., Vol. 258, p. 10083, 1983; Science, Vol. 237, p. 402-404, 1987) などを産生することが明かになっている。

【0007】また、最近のヒトゲノム解析において、脂肪細胞では他の種々のタンパク分子をコードする遺伝子の発現が見られることが明かとされている。例えば、apM1 (Adipose Most Abundant Gene Transcript-1) (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 221, p. 286-289, 1996)、大腿動脈や冠動脈の動脈硬化巣に蓄積し動脈硬化と関連するアポリポプロテインJ (apolipoprotein-J)、神経網膜の分化発達に關与する網膜上皮分化因子 (PDEF; pigment epithelium differentiation factor)、補体成分C1r、junD、アポリポプロテインD (apolipoprotein-D)、レシチン・コレステロール・アシルトランスフェラーゼ (lecithin-cholesterol acyltransferase)、インスリン様成長因子結合タンパク (insulin-like growth factor binding protein-3; IGFBP-3)、ヘパリン結合EGF様成長因子 (heparin binding EGF-like growth factor) 及びカルボキシペプチダーゼE (carboxypeptidase-E) といった既知タンパクをコードする遺伝子の発現が確認されている (医学のあゆみ, Vol. 184, No. 6, p. 534-538, 1998)。

【0008】内臓脂肪型肥満は、糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症、尿酸合成過剰に起因する高尿酸血症、睡眠時無呼吸症候群等の種々疾患に深く關与する可能性があることが報告されており (医学のあゆみ, Vol. 184, No. 6, p. 534-538, 1998)、例えば、肥満に伴う糖尿病、高脂血症、高トリグリセライド血症及び動脈硬化症については、前述の脂肪細胞が産生するTNF α がその発症に深く關与することが報告されている。肥満と糖尿病との関連性については、例えば、糖の細胞内取込みと利用促進に極めて重要なインスリンのインスリン受容体を介したシグナル伝達の1つのステップであるインスリン受容体基質-1 (insulin receptor substrate-1; IRS-1) のチロシンリン酸化が、脂肪細胞が分泌するTNF α の作用により阻害されセリンリン酸化されることにより細胞がインスリン抵抗性となることにより、肥満患者におけるインスリン非依存性糖尿病を発症させることが報告されている。また、肥満患者のインスリン抵抗性は、核内転写因子であるPPAR γ やインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性を抑制する蛋白として知られるPC-1などとの相互作用によってもおこることが示唆されている (Pharma Medica, Vol. 15, No. 9, p. 33-37, 1997)。

【0009】肥満と高脂血症、高トリグリセライド血症及び動脈硬化症との関連性については、例えば、インスリンは糖のみならず脂質の代謝に重要な役割 (腸管におけるコレステロール吸収の増加、LDL受容体活性の低下によるLDL代謝の遅延、LPL (リポ蛋白リパーゼ) 活性の

低下によるトリグリセライド代謝の遅延、及び肝臓におけるトリグリセライド産生の増加など) を担うが、前述のように脂肪細胞が分泌するTNF α などに作用により生体構成細胞がインスリン抵抗性になることにより脂質代謝に異常を来し、高脂血症、高トリグリセライド血症及び動脈硬化症などの発症を誘導することが報告されている (Pharma Medica, Vol. 15, No. 9, p. 39-44, 1997)。

【0010】このように、脂肪細胞及び/または脂肪細胞の動態が深く關与する組織、特に肥満に伴う合併症 (糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症、尿酸合成過剰に起因する高尿酸血症、睡眠時無呼吸症候群など) の発症に深く關与することが示唆されている内臓脂肪組織において発現、産生される生理活性物質を同定し、該生理活性物質の生物学的機能を解明することは、現代病とも言える肥満及び肥満に伴う該合併症の発症を予防しあるいは治療する薬剤の開発の道を切り開くものであり、このような脂肪細胞、脂肪組織 (特に内臓脂肪組織) の分子レベルでの解析に基づく薬剤の開発こそが21世紀に向けた医学・薬学における最重要課題として注目されている。ある組織あるいは細胞で有意な発現が見られる遺伝子を同定する方法としては、該組織や細胞が病巣部から採取された病理組織や病理細胞である場合には、該病理組織や病理細胞での種々遺伝子の発現状態を、対応する正常組織や正常細胞での遺伝子の発現状態と比較することにより、発現の差異の見られる遺伝子を特定することにより同定するというディファレンシャルディスプレイ (Differential Display) 法と呼ばれる遺伝子レベルでの比較検討が有用な方法として用いられている

(Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 18, p. 4272-4280, 1993年; Science, Vol. 257, p. 967-971, 1992; Genomics, Vol. 36, p. 316-319, 1996)。

【0011】また、解析しようとする組織や細胞が、内臓脂肪組織や脂肪細胞のようにそれ自体は正常な組織あるいは細胞である場合には、該内臓脂肪組織や脂肪細胞における遺伝子の発現状態と、他の正常組織や他の正常細胞での遺伝子の発現状態とをディファレンシャルディスプレイ法により同様に比較し、両者の間で遺伝子発現の差異が見られた遺伝子を特定することにより該内臓脂肪組織あるいは脂肪細胞に有意に発現の見られる遺伝子を同定することができる。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】内臓脂肪組織若しくは脂肪細胞に有意な発現が見られる遺伝子及び該遺伝子に由来するタンパク分子は、肥満 (内臓型肥満を含む) 及び/または肥満に伴う糖尿病動脈硬化症などの種々の疾患に密接に關与している可能性を有している。本発明は、内臓脂肪組織において有意に発現する遺伝子及びタンパク分子を特定することにより、肥満及び/または肥満、特に内臓型肥満に伴う合併症 (糖尿病、高脂血症、

高血圧、動脈硬化症、尿酸合成過剰に起因する高尿酸血症、睡眠時無呼吸症候群など）の発症の予防並びに治療のため薬剤及び方法を提供するものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ヒト内臓脂肪組織に有意な発現の見られる遺伝子の解析に関して鋭意研究した結果、下記のような特徴を有する新規な3つのタンパク分子をコードするヒト遺伝子（クローンAG1102、AA3901及びAA3401）を見出し本発明を完成するに到った。本発明の3つの新規なタンパクをコードする遺伝子は、ヒト内臓脂肪組織等の脂肪組織から同定されたものであり、且つ各々固有な組織特異性を有することから、内臓脂肪型肥満並びに肥満に伴う合併症（糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症、尿酸合成過剰に起因する高尿酸血症、睡眠時無呼吸症候群など）の発症及び進行に関連するタンパク分子をコードする遺伝子であると考えられる。

【0014】クローンAG1102は、次のような特徴を有する。

（1）子宮及び卵巣乳腺等の女性臓器組織、乳腺、並びに内臓脂肪組織で有意な発現が見られる。

（2）ノーザンブロッティング（Northern Blotting）により、該ヒト組織において約3.3kbのバンドとしてmRNAの発現が認められる。

（3）オープンリーディングフレーム（ORF）は、2,097個の塩基からなる塩基配列を有し（配列番号1）、該ORFは、16個のアミノ酸からなるシグナルペプチドを含め全体として699個のアミノ酸から構成されるアミノ酸配列をコードし、約79.8kDa（計算値）の分子量を有する（配列番号2）。

（4）コーディングタンパクのアミノ酸配列中には下記のような特徴的な構造が含まれている。

①細胞間接着において重要な配列であり、接着分子であるインテグリン並びに細胞間接着において重要な役割を果たす細胞外マトリックス（ECM）分子であるコラーゲン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン及びビトロネクチン等に共通して見られる特徴的な配列であるArg-Gly-Asp（RGD）配列。

②蛋白複合体の形成に関与するフォンビルブランド因子C様ドメイン（Von Willebrand factor C（VWFC）domain）。

③細胞内シグナル伝達、細胞間接着、細胞分化、DNA修復及びRNAのプロセッシングなどの種々の機能に関与すると考えられ、G蛋白共役型受容体、ECM分子、チロシンキナーゼ受容体及び神経成長因子などに共通して見られる特徴的な構造、即ち、ロイシン、イソロイシン及びバリン等の疎水性アミノ酸が繰返し出現するロイシンリッチリピート（Leucine-rich Repeat）と呼ばれる構造。

（5）コーディングタンパクは、マウス骨プロテオグリ

カンII前駆体（mousebone proteoglycan II precursor；Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 83, p. 7683-7687, 1986）、ウシのケラトカン（Keratocan；J. Biol. Chem., Vol. 271, p. 9759-9763, 1996）、及びラットのデコリン（Decorin；Eur. J. Cell. Biol., Vol. 59, p. 314-321, 1992）と各々33.7%、33.2%及び33.0%のアミノ相同性を有する。

（6）本クローンDNAに対応するゲノミックDNAは、遺伝性感覚根性ニューロパシーI型（hereditary sensory radicular neuropathy type I）や幼児神経症（infantile neurosis, infantile neuronophthisis）などの疾患の原因部位として知られる9q22.3で表わされる染色体上の位置を有する。

上記の（1）乃至（6）の特徴から、クローンAG1102によりコードされるタンパク分子は、細胞と細胞間、細胞と種々のECM分子間、並びにECM分子とECM分子間の相互認識機構において重要な役割を担う作用を有するものと考えられる。

【0015】クローンAA3901は、次のような特徴を有する。

（1）内臓脂肪組織及び脾臓、特に脾臓で特異的な発現が見られる。

（2）ノーザンブロッティング（Northern Blotting）により、該脾臓において約1.8kbのバンドとしてmRNAの発現が認められる。

（3）オープンリーディングフレーム（ORF）は、1,092個の塩基からなる塩基配列を有し（配列番号3）、該ORFは、364個のアミノ酸から構成されるアミノ酸配列をコードし、約38.7kDa（計算値）の分子量を有する（配列番号4）。

（4）コーディングタンパクのアミノ酸配列中には、シグナル配列、既知のモチーフ（motif）及び膜貫通部位等の構造的な特徴は見られない。

（5）コーディングタンパクは、既知のいずれのタンパク分子ともアミノ相同性を有しない。

（6）本クローンDNAに対応するゲノミックDNAは、15q22で表わされる染色体上の位置を有する。クローンAA3901は、既知の蛋白分子が有するような構造的な特徴は見られないものの、インスリン分泌器官であるランゲルハンス島が存在する脾臓にのみ有意な発現が観察されるという事実は、医学及び薬学上特に注目し、この組織特異性からクローンAA3901によりコードされるタンパク分子は、糖尿病の発症の制御に関係する分子であると考えられる。

【0016】クローンAA3401は、次のような特徴を有する。

（1）内臓脂肪組織で有意な発現が見られる。

（2）ノーザンブロッティング（Northern Blotting）により、該内臓脂肪組織において約4.4kbのバンドとしてmRNAの発現が認められる。

(3) オープンリーディングフレーム (ORF) は、2,832個の塩基からなる塩基配列を有し (配列番号5)、該ORFは、944個のアミノ酸から構成されるアミノ酸配列をコードし、約107.4kDa (計算値) の分子量を有する (配列番号6)。

(4) コーディングタンパクのアミノ酸配列中には、シグナル配列、既知のモチーフ (motif) 及び膜貫通部位等の構造的な特徴は見られない。

(5) コーディングタンパクは、ヒトのendosome-associated protein (J. Biol. Chem., Vol.270, p.13503-13511, 1995) 及びニトロリノミオシン重鎖 (myosin heavy chain; J. Mol. Biol., Vol.198, p.143-157, 1987) の α ヘリックス (α -helix; coiled-coil structure) 部分と各々21.6%及び22.6%のアミノ相同性を有することから、部分的に α ヘリックス構造を有すると予測される。

(6) 本クローンDNAに対応するゲノミックDNAは、1p12または1q21.1で表わされる染色体上の位置を有する。クローンAA3401は、推定される部分的 α ヘリックス構造以外は、既知の蛋白分子が有するような構造的な他の特徴は見られないものの、内臓脂肪組織にのみ有意な発現が観察されるという組織特異性から、クローンAA3401によりコードされるタンパク分子は、内臓脂肪肥満に伴う合併症、例えば、糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症、尿酸合成過剰に起因する高尿酸血症、睡眠時無呼吸症候群などの発症の制御に関係する分子であると考えられる。

【0017】即ち、本発明の遺伝子及びそれによりがコードするタンパク分子の上述のような特徴から、本発明の遺伝子 (DNA) 若しくはその一部、タンパク若しくはその一部、並びに該タンパク若しくはその一部に体する抗体若しくはその一部は、各々下記のように、内臓脂肪肥満、または内臓脂肪肥満に伴う合併症 (例えば、糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症、尿酸合成過剰に起因する高尿酸血症、及び睡眠時無呼吸症候群など) を予防及び/または治療するための医薬品として有用であり、また試験研究若しくは医薬品開発のためのツールとしての有用性を有する。

【0018】(1) 本発明の遺伝子 (DNA) によりコードされるタンパク分子の過剰発現が上記のような疾患の発症及び進行に対して促進的に働く場合
この場合には、該遺伝子あるいはタンパク若しくはその一部 (フラグメント) は、それらの疾患の治療及び予防のため薬剤開発のターゲットとすることができ、例えば、該遺伝子のmRNAへの転写を阻害する薬剤、該mRNAから本発明のタンパクへの翻訳を阻害する薬剤、該タンパクの生物活性を阻害する薬剤、該タンパクの産生を抑制する薬剤、あるいは該タンパクの受容体への結合若しくは他の分子との相互作用を阻害する薬剤などの薬剤設計、スクリーニングまたは活性測定 (アッセイ) のため

のツールとして有用である。例えば、該DNAは、そのような薬剤のスクリーニング及び活性測定 (アッセイ) において慣用される所謂レポータージーンアッセイ (reporter gene assay) 並びに該レポータージーンアッセイを原理としスクリーニングを機械 (ロボット) を用いて自動で行う所謂ハイスループットスクリーニング (High Throughput Screening) において極めて有用である (組織培養工学, Vol.23, No.13, p.521-524; 米国特許第5,670,113号)。

【0019】レポータージーンアッセイは、薬剤の標的となるタンパク分子をコードするDNA、該DNAの発現調節制御領域をコードするDNA、及びルシフェラーゼなどの蛍光を発するレポータータンパク分子をコードするDNAを標的タンパクが発現に依存して該レポータータンパク分子が発現可能なように挿入した発現ベクターで、遺伝子組換えタンパクの製造で一般的に使用される細胞を形質転換することによって得られた形質転換細胞に、被験化合物を接触させ、該化合物の作用に依存して産生される標的タンパクの量を、該標的タンパクの産生と同時に産生される該レポータータンパクが発する蛍光の量を測定することにより間接的に測定することにより、該化合物が、標的タンパクの産生に影響を与えるか否かを分析する手法である (米国特許第5,436,128号; 米国特許第5,401,629号)。

【0020】前述の本発明のDNA (遺伝子) のmRNAへの転写を阻害する薬剤または該mRNAから本発明のタンパクへの翻訳を阻害する薬剤としては、アンチセンス医薬品をあげることができる。即ち、本発明のDNA配列または該配列に対応するmRNA配列を基にアンチセンスDNAまたはアンチセンスRNAを設計することが可能であり、該アンチセンスDNA及びアンチセンスRNAは、各々該アンチセンス配列と相補的な配列を有するDNAまたはmRNAに結合することにより、DNAからmRNAへの転写または該mRNAからタンパクへの翻訳を阻害するメカニズムによるアンチセンス医薬品として有用である。前述の本発明のタンパクの生物活性を阻害する薬剤、該タンパクの産生を抑制する薬剤、あるいは該タンパクの受容体への結合若しくは他の分子との相互作用を阻害する薬剤としては、ペプチドアンタゴニスト、抗体あるいは低分子化合物をあげることができる。

【0021】即ち、本発明のタンパクのアミノ酸配列を基にペプチドアンタゴニストを設計することができ、該ペプチドアンタゴニストは、本発明のタンパクの他の分子 (例えば、受容体、リガンド) への結合を競合的に阻害することにより、本発明のタンパクが該分子との結合によって発生させるシグナルあるいは二次反応を阻害し、間接的に本発明のタンパクの生物学的機能が発揮されないようにする医薬品として有用である。また、本発明のタンパクまたはその一部に対する抗体 (特に、モノクローナル抗体) は、本発明のタンパクに結合すること

により該タンパクの生物活性の発揮を阻害（中和）することによる抗体医薬品として有用である。

【0022】（2）本発明の遺伝子（DNA）によりコードされるタンパク分子の発現が上記のような疾患の発症及び進行に依存して増大し、該タンパク分子が、該疾患の発症及び進行対して抑制的に働く場合

この場合には、本発明のタンパクまたはその一部（例えば、その生物活性領域）自体が、医薬品として有用である。また、本発明の遺伝子（DNA）は、遺伝子治療により患者に投与することができそれ自体医薬品として有用である。さらに、前記（1）の場合と同様に、本発明のDNA（遺伝子）あるいはタンパク若しくはその一部（フラグメント）は、それらの疾患の治療及び予防のため薬剤開発のターゲットとすることができ、例えば、該タンパクの産生を誘導／促進する低分子薬剤などの薬剤設計、スクリーニングまたは活性測定（アッセイ）のためのツールとして有用である。例えば、該DNAは、前記

（1）と同様に、そのような薬剤のスクリーニング及び活性測定（アッセイ）において慣用される所謂レポータージーンアッセイ並びに該レポータージーンアッセイを原理としスクリーニングを機械を用いて自動で行う所謂ハイスループットスクリーニングにおいて極めて有用である。

【0023】上記（1）及び（2）に加え、本発明の遺伝子（DNA）、タンパク、及び抗体は、本発明のタンパクと相互作用を有するタンパク（受容体及びリガンド）の探索、該リガンドの機能の解明、並びに該リガンドをターゲットとした医薬品開発における試験研究試薬として有用である。また、本発明のDNA態様の1つであるヒト由来のDNAをマウス等のヒト以外の哺乳動物に導入することによりモデル動物としてのトランスジェニック動物を作製することができる。

【0024】同様に、本発明のDNAの態様に包含されるウサギあるいはマウス由来のDNAの遺伝子情報をもとに、それらに対応する内在性遺伝子を破壊（不活性化）することによりモデル動物（ノックアウト動物）を作成することが可能である。これらのモデル動物の物理学的、生物学的、病理学的及び遺伝子的特徴を分析することにより、本発明に係る遺伝子及びタンパクの機能を解明することが可能となる。さらに、そのようにして内在性遺伝子が破壊された該モデル動物と該トランスジェニック動物を交配することにより、本発明のヒト由来遺伝子（DNA）のみを有するモデル動物を作成することが可能である。このモデル動物に、該導入されたヒト遺伝子をターゲットとした薬剤（化合物、抗体等）を投与することにより、その薬剤の治療学的効果を評価することが可能となる。

【0025】本発明は、即ち、下記のDNA、タンパク、発現ベクター、形質転換体、抗体、医薬組成物、トランスジェニック非ヒト哺乳動物を初めて提供するもの

である。

（1）配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクまたはその一部をコードするDNA。

（2）配列番号1に記載される塩基配列の塩基番号74乃至2170の塩基配列を含むDNA。

（3）配列番号1に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

（4）配列番号2に記載されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク、またはその一部。

（5）前記（1）乃至前記（3）のいずれかに記載のDNAを含む発現ベクター。

（6）前記（5）に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

（7）前記（4）に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有する抗体または抗体の一部。

（8）抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする前記（7）に記載の抗体または抗体の一部。

（9）前記（4）に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞。

（10）該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能力を有する非ヒト哺乳動物由来のB細胞と哺乳動物由来のミエロマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする前記（9）に記載の細胞。

（11）該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードするDNA若しくはその軽鎖をコードするDNAのいずれか一方のDNA、または両方のDNAが細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする前記（9）に記載の細胞。

（12）前記（4）に記載のタンパク若しくはその一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

（13）前記（7）または前記（8）に記載の抗体若しくは抗体の一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

（14）配列番号1に記載される塩基配列の塩基番号74乃至2170の塩基配列を含むDNAが、非ヒト哺乳動物の内在性遺伝子に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

（15）配列番号4に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクまたはその一部をコードするDNA。

（16）配列番号3に記載される塩基配列の塩基番号131乃至1221の塩基配列を含むDNA。

（17）配列番号3に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

（18）配列番号4に記載されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク、またはその一部。

(19) 前記(15)乃至前記(17)のいずれかに記載のDNAを含む発現ベクター。

(20) 前記(19)に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

(21) 前記(18)に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有する抗体または抗体の一部。

(22) 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする前記(21)に記載の抗体または抗体の一部。

(23) 前記(18)に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞。

(24) 該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能力を有する非ヒト哺乳動物由来のB細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする前記(23)に記載の細胞。

(25) 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードするDNA若しくはその軽鎖をコードするDNAのいずれか一方のDNA、または両方のDNAが細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする前記(23)に記載の細胞。

(26) 前記(18)に記載のタンパク若しくはその一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

(27) 前記(21)または前記(22)に記載の抗体若しくは抗体の一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

(28) 配列番号3に記載される塩基配列の塩基番号131乃至1221の塩基配列を含むDNAが、非ヒト哺乳動物の内在性遺伝子に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

(29) 配列番号6に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクまたはその一部をコードするDNA。

(30) 配列番号5に記載される塩基配列の塩基番号351乃至3180の塩基配列を有するDNA。

(31) 配列番号5に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(32) 配列番号6に記載されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク、またはその一部。

(33) 前記(29)乃至前記(31)のいずれかに記載のDNAを含む発現ベクター。

(34) 前記(33)に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

(35) 前記(32)に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有する抗体または抗体の一部。

(36) 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする前記(35)に記載の抗体または抗体の一部。

(37) 前記(32)に記載のタンパクまたはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞。

(38) 該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能

力を有する非ヒト哺乳動物由来のB細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする前記(37)に記載の細胞。

(39) 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードするDNA若しくはその軽鎖をコードするDNAのいずれか一方のDNA、または両方のDNAが細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする前記(37)に記載の細胞。

(40) 前記(32)に記載のタンパク若しくはその一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

(41) 前記(35)または前記(36)に記載の抗体若しくは抗体の一部、及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

(42) 配列番号5に記載される塩基配列の塩基番号351乃至3180の塩基配列を含むDNAが、非ヒト哺乳動物の内在性遺伝子に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【0026】

【発明の実施の形態】以下、本発明で用いる語句の意味、並びに本発明のDNA、タンパク、抗体、医薬組成物、及びトランスジェニック非ヒト哺乳動物などの一般的な製造方法並びにを明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。本発明の「タンパク」は、ヒト、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、ウサギ、ラット、ハムスター、モルモット、及びマウスなどの哺乳動物由来のタンパクであり、好ましくはヒト、ウサギ、ラットまたはマウス由来のタンパクであり、特に好ましくはヒト由来のタンパクである。特に好ましい態様としては、

(1) 配列番号2に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク、(2) 配列番号4に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク、及び(3) 配列番号6に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパクを挙げることができる。

【0027】ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」とは、配列番号2、4または6に示されるアミノ酸配列を含むタンパクと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が置換、欠失及び/または修飾されているアミノ酸配列を有するタンパク、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するタンパクをも包含することを意味する。

【0028】本発明の「タンパクの一部」とは、前述した本発明のタンパクが有するアミノ酸配列中の任意の部分配列(フラグメント)を意味し、例えば5乃至300

個のアミノ酸残基を有する部分配列、具体的には5乃至200個のアミノ酸残基を有する部分配列、より具体的には5乃至100個のアミノ酸残基を有する部分配列、さらに具体的には5乃至50個のアミノ酸残基を有する部分配列が挙げられる。好ましくは、本発明のタンパクがその生物学的機能を発揮するために必要な部位、または本発明のタンパクが他のタンパク分子（受容体やリガンド）と結合若しくは相互作用する部位を含む部分配列を挙げることができる。

【0029】なお、本願明細書または図面においてアミノ酸を表記するために用いられるアルファベットの三文字あるいは一文字は、各々次に示すアミノ酸を意味する。(Gly/G) グリシン、(Ala/A) アラニン、(Val/V) バリン、(Leu/L) ロイシン、(Ile/I) イソロイシン、(Ser/S) セリン、(Thr/T) スレオニン、(Asp/D) アスパラギン酸、(Glu/E) グルタミン酸、(Asn/N) アスパラギン、(Glu/Q) グルタミン、(Lys/K) リジン、(Arg/R) アルギニン、(Cys/C) システイン、(Met/M) メチオニン、(Phe/F) フェニルアラニン、(Tyr/Y) チロシン、(Trp/W) トリプトファン、(His/H) ヒスチジン、(Pro/P) プロリン。

【0030】本発明のタンパクまたはその一部は、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。本発明のDNAは、前述の本発明のタンパクまたはその一部をコードするDNAであって、本発明のタンパクまたはその一部をコードし得るいかなる塩基配列をも包含する。好ましくは、本発明のヒト由来のタンパクをコードするDNAである。具体的な態様としては、下記のDNAが挙げられる。

【0031】(1) 配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパク（若しくはその一部）、または該タンパク（若しくはその一部）のアミノ酸配列中に複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸を置換、欠失及び/または修飾するか、若しくは該アミノ酸配列に複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸を挿入することによって得られる生物学的同等物を各々コードするDNA。

(2) 配列番号4に記載されるアミノ酸配列を有するタンパク（若しくはその一部）、または該タンパク（若しくはその一部）のアミノ酸配列中に複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸を置換、欠失及び/または修飾するか、若しくは該アミノ酸配列に複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸を挿入することによって得られる生物学的同等物を各々コードするDNA。

(3) 配列番号6に記載されるアミノ酸配列を有するタ

ンパク（若しくはその一部）、または該タンパク（若しくはその一部）のアミノ酸配列中に複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸を置換、欠失及び/または修飾するか、若しくは該アミノ酸配列に複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸を挿入することによって得られる生物学的同等物を各々コードするDNA。

(4) 配列番号1に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(5) 配列番号3に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(6) 配列番号5に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【0032】より具体的には、(1) 配列番号1に記載される塩基配列の塩基番号74乃至2170の塩基配列を含むDNA、(2) 配列番号3に記載される塩基配列の塩基番号131乃至1221の塩基配列を含むDNA、及び(3) 配列番号5に記載される塩基配列の塩基番号351乃至3180の塩基配列を含むDNAである。本発明のDNAは、ゲノミックDNAまたはcDNA、さらにはそれらのアンチセンスDNAのいずれをも包含する。また、該DNAは、同一のアミノ酸をコードするコドンであればどのようなコドンから構成されるDNAを含む。

【0033】ここで「ストリンジェントな条件下」としては、例えば、次のような条件を挙げることができる。例えば、50塩基以上のプローブを用い、0.9%NaCl下でハイブリダイゼーションを行う場合には、50%の解離を生ずる温度 (T_m) の目安を下記計算式から求め、ハイブリダイゼーションの温度を下記計算式のように設定することができる。

$$T_m = 82.3^{\circ}\text{C} + 0.41 \times (\text{G+C}) \% - 500 / n - 0.61 \times (\text{フォルムアミド}) \%$$

(nはプローブの塩基数を示す。)

$$\text{温度} = T_m - 25^{\circ}\text{C}$$

また、100塩基以上のプローブ ($\text{G+C}=40\sim 50\%$ の場合) を用いる場合には、 T_m が下記(1)及び(2)のように変化することを目安する。

(1) 1%ミスマッチ毎に、 T_m が約 1°C 下がる。

(2) フォルムアミド1%毎に、 T_m が $0.6\sim 0.7^{\circ}\text{C}$ 下がる。

従って、完全相補鎖の組み合わせの場合の温度条件は下記のようにすることができる。

(A) $65\sim 75^{\circ}\text{C}$ (フォルムアミド無添加)

(B) $35\sim 45^{\circ}\text{C}$ (50%フォルムアミド存在下)

また、不完全相補鎖の組み合わせの場合の温度条件は下記のようにすることができる。

(A) 45~55℃ (フォルムアミド無添加)
(B) 35~42℃ (30%フォルムアミド存在下)
また、23塩基以下のプローブを用いる場合の温度条件は、37℃とすることもできるし、また下記計算式を目安とすることもできる。

温度 = $2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T} \text{ の数}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{C}+\text{G} \text{ の数}) - 5^{\circ}\text{C}$

【0034】また、本発明のDNAは、いかなる方法で得られるものであってもよい。例えばmRNAから調製される相補DNA (cDNA)、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、RNAまたはDNAを鋳型としてPCR法で増幅させて得られるDNAおよびこれらの方法を適当に組み合わせて構築されるDNAをも全て包含するものである。本発明のタンパクをコードするDNAは、常法に従って本発明のタンパクのmRNAからcDNAをクローン化する方法、ゲノムDNAを単離してサブライシング処理する方法、化学合成する方法等により取得することができる。

【0035】(1) 例えば、本発明のタンパクのmRNAからcDNAをクローン化する方法としては、以下の方法が例示される。まず、本発明のタンパクを発現・産生する前述のような組織あるいは細胞から該本発明のタンパクをコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニジンチオシアネート法 (チャークウィン (Chirgwin) ら、バイオケミストリー (Biochemistry)、第18巻、第5294頁、1979年)、熱フェノール法もしくはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ (dT) セルロースやポリウーセファロース等によるアフィニティクロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

【0036】次いで得られたmRNAを鋳型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の方法、例えばオカヤマらの方法 (モレキュラーセルバイオロジー (Mol. Cell Biol.))、第2巻、第161頁、1982年及び同誌第3巻、第280頁、1983年) やホフマン (Hoffman) らの方法 (ジーン (Gene)、第25巻、第263頁、1983年) 等によりcDNA鎖を合成し、cDNAの二本鎖cDNAへの変換を行う。このcDNAをプラスミドベクターもしくはファージベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、大腸菌に形質移入 (トランスフェクト) することによりcDNAライブラリーを作製する。

【0037】ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるクローニング用ベクターとしてpUC19、λgt10、λgt11等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内で本発明のタンパクをコードする遺伝子を発現させるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

【0038】プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、例えばマニアティス (Maniatis) らの方法 (モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition)、コールドスプリングハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、第1.53頁、1989年) に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、ヒュン (Hyunh) らの方法 (DNAクローニング、プラクティカルアプローチ (DNA Cloning, a practical approach)、第1巻、第49頁、1985年) などが挙げられる。簡便には、市販のクローニングキット (例えば、宝酒造製等) を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞 (例えば、E. coli: HB101、DH5αまたはMC1061/P3等) 等の適当な宿主に導入する。

【0039】プラスミドを宿主に導入する方法としては、(モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition)、コールドスプリングハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、第1.74頁、1989年) に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージDNAをインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット (例えば、ストラタジーン製、アマシャム製等) を用いることによって簡便に行うことができる。

【0040】上記の方法によって作製されたcDNAライブラリーから、本発明のタンパクをコードするcDNAを単離する方法は、一般的なcDNAスクリーニング法を組み合わせることによって行うことができる。例えば、別個に本発明のタンパクのアミノ酸配列に対応すると考えられるオリゴヌクレオチドを化学合成したのち、これを³²Pまたは[α-³²P]dCTPで標識してプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法 (克蘭シュタイン (Crunstein) ら、プロシーディングスオブナショナルアカデミーオブサイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第72巻、第3961頁、1975年) またはブランクハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory、第2.108頁、1989年) により、目的のcDNAを含有するクローンをスクリーニングする方法、PCRプライマーを作製し本発明のタンパクの特定領域をPCR法により増幅し、該領域をコードするDNA断片を有するクローンを選択する方法等が挙げられる。

【0041】また、cDNAを発現しうるベクター (例

例えば、 λ gt11ファージベクター)を用いて作製したcDNAライブラリーを用いる場合には、本発明のタンパクに反応性を有する抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。この様にして得られたDNAの塩基配列はマキシム・ギルバート法(マキシム(Maxam)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第560頁、1977年)あるいはファージM13を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法(サンガー(Sanger)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第5463~5467頁、1977年)によって決定することができる。本発明のタンパクをコードする遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

【0042】(2)また、前述のような本発明のタンパクを発現する細胞に由来するゲノムDNAから本発明のタンパクをコードするDNAを単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。該細胞を好ましくはSDSまたはプロテナーゼK等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復してDNAの脱蛋白質を行う。RNAを好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られるDNAを適当な制限酵素により部分消化し、得られるDNA断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作成する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識されたDNAプローブを用いる方法等により検出し、該クローンから本発明のタンパクをコードする遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。ヒト由来タンパクをコードするcDNAを取得する場合には、さらにヒトゲノムDNA(染色体DNA、ゲノミックDNA)が導入されたコスミドライブラリー(「ラボマニュアルヒトゲノムマッピング」、堀雅明及び中村祐輔 編、丸善出版)を作製し、該コスミドライブラリーをスクリーニングすることにより、目的のタンパクのコーディング領域のDNAを含む陽性クローンを得、該陽性クローンから切り出したコーディングDNAをプローブとして用い、前述のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより調製することもできる。

【0043】(3)また、化学的合成による本発明のDNAの製造は、配列番号1、3または5に記載される塩基配列をもとにして、常法に従って行うことができる。さらに本発明は、上述の本発明のタンパクをコードするDNAを含有する組換えベクターに関する。本発明の組換えベクターとしては、原核細胞及び/または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが包含される。

【0044】当該組換えベクターは、簡便には当業界に

おいて入手可能な組換え用ベクター(プラスミドDNAおよびバクテリアファージDNA)に本発明のタンパクをコードするDNAを常法により連結することによって調製することができる。用いられる組換え用ベクターとして具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC19など、酵母由来プラスミドとして例えばpSH19、pSH15など、枯草菌由来プラスミドとして例えばpUB110、pTP5、pC194などが例示される。また、ファージとしては、 λ ファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニアウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス(pVL1393、インビトロゲン製)が例示される。

【0045】本発明のタンパクをコードするDNAを発現させ本発明のタンパクを生産させる目的においては、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、原核細胞および/または真核細胞の各種の宿主細胞中で本発明のタンパクをコードする遺伝子を発現し、これら蛋白質を生産する機能を有するものであれば特に制限されない。例えば、pMAL C2、pEF-BOS(ヌクレイックアシッドリサーチ(Nucleic Acid Research)、第18巻、第5322頁、1990年等)あるいはpME18S(実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、1992年等)等を挙げることができる。

【0046】宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーターオペレーター領域、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、本発明のタンパクをコードする遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子(マーカー)を含んでいてもよい。

【0047】細菌中で本発明のタンパクを発現させるためのプロモーターオペレーター領域は、プロモーター、オペレーターおよびShine-Dalgarno(SD)配列(例えば、AAGGなど)を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適にはTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどを含むものが例示される。酵母中で本発明のタンパクを発現させるためのプロモーターとしては、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチル

ス属菌の場合は、SLO1プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。好ましくは、SV-40、レトロウイルスである。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。

【0048】好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン(ATG)が例示される。終止コドンとしては、常用の終止コドン(例えば、TAG、TGA、TAA)が例示される。ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。

【0049】複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAを言い、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド(天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント)および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coli ではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物(pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント)が、酵母では酵母2 μ プラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミドpRSVneo ATCC 37198、プラスミドpSV2dhfr ATCC 37145、プラスミドpdpBPV-MMTneo ATCC 37224、プラスミドpSV2neo ATCC 37149等があげられる。

【0050】エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。

【0051】遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパルラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント(例えば、リンカー、他のリストラクションサイトなど)を用いることができ

る。

【0052】本発明の形質転換細胞は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。本発明で用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換え細胞など種々の細胞(例えば、細菌(エシェリキア属菌、バチルス属菌)、酵母(サッカロマイセス属、ピキア属など)、動物細胞または昆虫細胞など)が例示される。

【0053】好ましくは大腸菌あるいは動物細胞であり、具体的には大腸菌(DH5 α 、TB1、HB101等)、マウス由来細胞(COP、L、C127、Sp2/0、NS-1またはNIH3T3等)、ラット由来細胞、ハムスター由来細胞(BHKおよびCHO等)、サル由来細胞(COS1、COS3、COS7、CV1およびVelo等)およびヒト由来細胞(HeLa、2倍体線維芽細胞に由来する細胞、HEK293細胞、ミエローマ細胞およびNamalwa等)などが例示される。

【0054】発現ベクターの宿主細胞への導入(形質転換(形質移入))は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、細菌(E. coli、Bacillus subtilis等)の場合は、例えばCohenらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 69, p. 2110, 1972)、プロトプラスト法(Mol. Gen. Genet., Vol. 168, p. 111, 1979)やコンピテント法(J. Mol. Biol., Vol. 56, p. 209, 1971)によって、Saccharomyces cerevisiaeの場合は、例えばハイネン(Hinnen)らの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 75, p. 1927, 1978)やリチウム法(J. Bacteriol., Vol. 153, p. 163, 1983)によって、動物細胞の場合は、例えばグラハム(Graham)の方法(Virology, Vol. 52, p. 456, 1973)、昆虫細胞の場合は、例えばサマーズ(Summers)らの方法(Mol. Cell. Biol., Vol. 3, p. 2156-2165, 1983)によってそれぞれ形質転換することができる。

【0055】本発明のタンパクは、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換細胞(以下、形質移入体を包含する意味で使用する。)を栄養培地で培養することによって製造することができる。栄養培地は、宿主細胞(形質転換体)の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素(例えば、無機塩(例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム)、ビタミン類、抗生物質(例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等)な

ど)を含んでいてもよい。培養は当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpHおよび培養時間は、本発明のタンパクが大量に生産されるように適宜選択される。

【0056】なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5~8である培地である。宿主がE. coliの場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地(ミラー(Miller)ら、Exp. Mol. Genet., Cold Spring Harbor Laboratory, p. 431, 1972)等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14~43℃、約3~24時間行うことができる。宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30~40℃、約16~96時間行うことができる。

【0057】宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培(ボスチアン(Bostian), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, p. 4505, 1980)が挙げられ、pHは5~8であることが望ましい。培養は通常約20~35℃で約14~144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地(Science, Vol. 122, p. 501, 1952)、DMEM培地(Virology, Vol. 8, p. 396, 1959)、RPMI 1640培地(J. Am. Med. Assoc., Vol. 199, p. 519, 1967)、199培地(proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 73, p. 1, 1950)等を用いることができる。培地のpHは約6~8であるのが好ましく、培養は通常約30~40℃で約15~72時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's培地(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 8404, 1985)等が挙げられ、そのpHは約5~8であるのが好ましい。培養は通常約20~40℃で15~100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0058】本発明のタンパクは、前述した本発明のDNAを用いて上述のようにして作製した形質転換体を前記のような培養条件下で培養することにより培養上清中または細胞内に産生及び/または分泌させることにより製造することができる。すなわち、本発明のタンパクが培養上清中に分泌されるように製造される場合には、得られた培養物を濾過または遠心分離等の方法で培養濾液(上清)を得、該培養濾液から天然または合成蛋白質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って該本発明のタンパクを精製、単離する。単離、精製方法としては、例えば塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量

の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0059】一方、本発明のタンパクが培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合は、培養物を濾過または遠心分離などの常法に付して菌体あるいは細胞を集め、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および/または細胞膜を破壊した後、遠心分離や過などの方法で本発明のタンパクを含有する膜画分を得る。該膜画分をトライトン-X100等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る。そして、当該粗溶液を先に例示したような常法を用いることにより、単離、精製することができる。

【0060】本発明における「トランスジェニック非ヒト哺乳動物」は、本発明のタンパクに包含されるヒト由来のタンパクをコードするDNA(cDNAまたはゲノミックDNA)が、非ヒト哺乳動物(例えばマウス)の内在性遺伝子座上にインテグレート(integrate)されており、体内に該DNAによりコードされる本発明のタンパクを発現、分泌するヒト以外のトランスジェニック哺乳動物を意味する。該トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、トランスジェニック動物の製造において通常使用されるような常法(例えば、最新動物細胞実験マニュアル、エル・アイ・シー発行、第7章、第361~第408頁、1990年を参照)に従って作製することができる。

【0061】具体的には、例えば、トランスジェニックマウスの場合には、正常マウス胚盤胞(blastocyst)のから取得した胚性幹細胞(Embryonic Stem Cell, ES Cell)を、本発明のヒト由来のタンパクをコードする遺伝子及びマーカー遺伝子(例えば、ネオマイシン耐性遺伝子)が発現可能なように挿入された発現ベクターで形質転換する。該本発明のヒト由来のタンパクをコードする遺伝子が内在性遺伝子上にインテグレートされたES細胞を、マーカー遺伝子の発現の有無に基づいて常法により選別する。次いで、選別したES細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵(胚盤胞)にマイクロインジェクションする(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, No. 12, pp. 7380-7384, 1980; 米国特許第4,873,191号公報)。該胚盤胞を仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。そうして該仮親マウスから、ファウンダーマウス(子マウス)が生まれる。該ファウンダーマウスを正常マウスと交配させることによりヘテロトランスジェニックマウスを得る。該ヘテロ(heterogeneous)トランスジェニックマウス同士を交配することにより、メ

ンデルの法則に従って、ホモ (homogeneous) トランスジェニックマウスが得られる。

【0062】また、本発明に包含されるマウスに由来するタンパクをコードするDNAの塩基配列に基づいて、いわゆる「ノックアウトマウス」を作製することができる。本発明における「ノックアウトマウス」とは、本発明のマウス由来のタンパクをコードする内在性遺伝子がノックアウト (不活性化) されたマウスであり、例えば相同組換えを応用したポジティブネガティブセレクション法 (米国特許第5,464,764号公報、同5,487,992号公報、同5,627,059号公報、Proc. Natl. Acad. Sci. US A, Vol. 86, 8932-8935, 1989、Nature, Vol. 342, 435-438, 1989など) を用いて作製することができ、このようなノックアウトマウスも本発明の一態様である。

【0063】本発明における「抗体」とは、ポリクローナル抗体 (抗血清) あるいはモノクローナル抗体を意味し、好ましくはモノクローナル抗体である。具体的には、前述の本発明のタンパクまたはその一部 (フラグメント) に反応性を有する抗体である。本発明の「抗体」は、本発明のタンパク若しくはその一部 (天然体、組換体、合成物)、または該タンパクを産生、分泌している細胞を免疫原 (抗原) として、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の非ヒト哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体 (CDR-grafted 抗体)、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体も包含する。またモノクローナル抗体の場合には、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体をも包含する。好ましくは、IgGまたはIgMである。

【0064】本発明で言うポリクローナル抗体 (抗血清) あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、前記のような免疫原 (抗原) を、必要に応じてフロイントアジュバント (Freund's Adjuvant) とともに、哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞 (ミエロマ細胞) からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

【0065】モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述のような

本発明のタンパクあるいは該タンパクを発現している細胞等を免疫原として、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント (Freund's Adjuvant) とともに、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター (ヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む) の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。

【0066】モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法 (ネイチャー (Nature)、第256巻、第495~第497頁、1975年) 及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエロマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

【0067】細胞融合に用いられるミエロマ細胞としては、例えばマウス由来ミエロマP3/X63-Ag8.653 (653; ATCC No. CRL1580)、P3/NS1/1-Ag4-1 (NS-1)、P3/X63-Ag8.U1 (P3U1)、SP2/0-Ag14 (Sp2/O、Sp2)、PA1、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエロマ210RCY3-Ag.2.3、ヒト由来ミエロマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11あるいはCEM-T15を使用することができる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述のマウス免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

【0068】ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特長、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施するこ

とが可能である。

【0069】基本培地としては、例えば、Ham'F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含有することができる。モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロリン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

【0070】また、当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、トランスジェニック動物作製技術を用いて当該抗体コーディング遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウ、ヤギ、ヒツジまたはブタを作製し、当該トランスジェニック動物のミルク中から当該抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である（日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

【0071】本発明における「キメラ抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、例えば、その可変領域がマウスイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換キメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。本発明におけるキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

【0072】例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第16巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なVH遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得したCH遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また該ハイブリド

ーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なVL遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子）の下流にヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得したCL遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

【0073】具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素（例えばEcoRI、HindIII等）を用いて消化し、電気泳動に付して（例えば0.7%アガロースゲル使用）サザンブロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25M HCl溶液に15分間浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ペイキング（75℃、3時間）を行う。ペイキング終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3～4時間処理する。

【0074】次に、この中に³²P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65℃で12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間（例えば、2×SSC-0.1%SDS溶液、室温、10分間）のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

【0075】上記サザンブロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分離し、ファージベクター（例えば、Charon 4A、Charon 28、λEMBL3、λEMBL4等）に組み込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539等）を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適当なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（κ）J遺伝子等）を用いて、例えばベントンデイス法（サイエンス（Science）、第196巻、第180～第182頁、1977年）に従って、ブランクハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列されたVH（VDJ）遺伝子あるい

はVL(VJ)遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

【0076】一方、キメラ化に用いるヒトCH遺伝子及びヒトCL遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、CH遺伝子であるC γ 1遺伝子とCL遺伝子であるC κ 遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒトC γ 1遺伝子及びヒトC κ 遺伝子に相当するマウスC γ 1遺伝子及びマウスC κ 遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

【0077】具体的には、例えば、クローンIg146 (プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第75巻、第4709～第4713頁、1978年)からの3kbのHindIII-BamHI断片とクローンMEP10 (プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第78巻、第474～第478頁、1981年)からの6.8kbのEcoRI断片をプローブとして用い、ヒトのラムダCharon 4AのHaeIII-AluIゲノムライブラリー (セル(Cell)、第15巻、第1157～第1174頁、1978年)中から、ヒトC κ 遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒトC γ 1遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAをHindIIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9kbのバンドを λ 788に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

【0078】このようにして単離されたマウスVH遺伝子とマウスVL遺伝子、及びヒトCH遺伝子とヒトCL遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウスVH遺伝子の下流にヒトCH遺伝子を、またマウスVL遺伝子の下流にヒトCL遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えばpSV2gptあるいはpSV2neo等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウスVH遺伝子/ヒトCH遺伝子とマウスVL遺伝子/ヒトCL遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

【0079】このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63・Ag8・653細胞あるいはSP210細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得

する。

【0080】本発明における「ヒト型抗体 (CDR-grafted抗体)」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、例えば、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部がマウスモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

【0081】ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域 (Complementarity-determining residue; CDR1、CDR2、CDR3)を指し、また可変領域の枠組領域とは、該3つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域 (Framework; FR1、FR2、FR3、FR4)を指す。換言すれば、例えばマウスモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明におけるヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

【0082】本発明におけるヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものではないことは言うまでもない。例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換えヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、前マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。

【0083】単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子/ヒ

トH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子/ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

【0084】本発明における「ヒト抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。ヒト抗体は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、Nature Genetics, Vol. 15, p. 146-156, 1997; Nature Genetics, Vol. 7, p. 13-21, 1994; 特表平4-504365号公報; 国際出願公開W094/25585号公報; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年; Nature, Vol. 368, p. 856-859, 1994; 及び特表平6-500233号公報に記載の方法に従って作製することができる。

【0085】本発明における「抗体の一部」とは、前述の本発明における抗体、好ましくはモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv (variable fragment of antibody)、sFv、dsFv (disulphide stabilised Fv) あるいはdAb (single domain antibody) である (Exp. Opin. Ther. Patents, Vol. 6, No. 5, p. 441-456, 1996)。ここで、「F(ab')₂」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL (L鎖可変領域) とCL (L鎖定常領域) からなるL鎖、及びVH (H鎖可変領域) とCH_γ1 (H鎖定常領域中のγ1領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々Fab'という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')₂という。

【0086】本発明の「タンパクまたはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞」とは、前述した本発明のモノクローナル抗体を産生する任意の細胞を意味する。具体的には、(1) 前述したとおりの、本発明のタンパク、その一部または該タンパクを産生する細胞等で非ヒト哺乳動物を免疫して得られる本発明のタンパクまたはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する該非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体産生B細胞、(2) そのようにして得られた抗体産生B細胞を哺乳動物由来のミエローマ細胞と細胞融合して得られる前述のハイブリドーマ (融合細胞)、あるいは(3) 該モノクローナル抗体産生B細胞またはモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから単離される該モノクローナル抗体をコードする遺伝子 (重鎖をコードする遺伝子若しくは軽鎖をコードする遺伝子のいずれか一方、または両方の遺伝子) により該B細胞及びハイブリドーマ以外の細胞を形質転換して得られるモノクローナル抗体産生形質転換細胞のいずれかを意味する。ここで、前記(3)に記載のモノクローナル抗体産生形質転換細胞は、即ち、前記(1)のB細胞または(2)のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の遺伝子組換え体を産生する遺伝子組換え細胞を意味する。この組換えモノクローナル抗体産生細胞は、前述したキメラモノクローナル抗体及びヒト型抗体の製造において使用される方法と同様にして製造することができる。

【0087】本発明の「医薬組成物」とは、前記で定義される本発明のタンパク若しくはその一部 (フラグメント)、抗体または抗体の一部のいずれかと、薬学的に許容され得る担体とからなる医薬組成物である。ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびベッサリーなどが含まれる。

【0088】投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分 (前記タンパクや抗体など) の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき10μgから1000mg (あるいは10μgから500mg) の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量

が必要な場合もある。とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に0.1 μ g抗体/ml担体~10mg抗体/ml担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において1kg体重あたり、1 μ g~100mgの割合で、好ましくは50 μ g~50mgの割合で、1日あたり1回~数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

【0089】また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。本発明の医薬組成物は、内臓脂肪肥満、または内臓脂肪肥満に伴う合併症（例えば、糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症、尿酸合成過剰に起因する高尿酸血症、及び睡眠時無呼吸症候群など）を予防及び/または治療するために用いることができる。

【0090】

【実施例】以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

【0091】実施例1 ヒトの各種組織からの全RNA (poly(A)⁺RNA) の調製

胃癌患者の外科手術時に切除された内臓脂肪組織から、トリゾール (TRIZOL) 試薬 (GIBCO BRL製) を用いて、常法により全RNAを取得し、oligotex-dt30<Super> (TAKARA製) を加えてpoly(A)⁺RNAを精製した。また、種々のヒト組織（心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球、胃、子宮、及び乳腺）に由来するpoly(A)⁺RNA mRNAをClontech社から購入した。

【0092】実施例2 ヒト各種組織に由来するcDNA断片の合成

実施例1で得た各々の組織に由来するpoly(A)⁺RNA（各組織について0.2 μ g）を、DEPC (diethyl pirocarbate) 処理した蒸留水 (10 μ l) に溶解し、次いで、下記の4種類のアンカープライマー混合物（各々1 μ l、濃度25pmol/ μ l）の各々を加え各々全量11 μ lとし、65℃で5分間インキュベートした。インキュベート後すぐに氷上に静置した。

【0093】<アンカープライマー混合物>

- ① G(T)15AG (配列番号13)、G(T)15GG (配列番号14)、及びG(T)15CG (配列番号15) との混合物。
- ② G(T)15AT (配列番号16)、G(T)15GT (配列番号17)、及びG(T)15CT (配列番号18) との混合物。
- ③ G(T)15AA (配列番号19)、G(T)15GA (配列番号20)、及びG(T)15CA (配列番号21) との混合物。
- ④ G(T)15AC (配列番号22)、G(T)15GC (配列番号23)、及びG(T)15CC (配列番号24) との混合物。

【0094】次いで、各々のサンプルについて、5xファーストストランドバッファー (first strand buffer, 4 μ l、<組成>: 0.25Mのトリス塩酸(pH7.5)、0.375Mの塩化カリウム、0.05MのDTT及び0.015Mの塩化マグネシウム)、0.1MのDTT (2 μ l)、2.5mMのdNTP (1 μ l)、RNase inhibitor (40units/ μ l, TOYOBO製) 及び逆転写酵素 (SuperscriptII, Gibco BRL製、1 μ l、濃度200U/ μ l) を加えて各々全量を20 μ lとした。42℃で1時間インキュベートした後、DEPC H₂O (30 μ l) を加えて全量を50 μ lとし、各々のヒト組織毎に4種類のcDNA断片群を合成した。即ち、例えば、ヒト内臓脂肪組織については、上記①のプライマーを用いて調製したcDNA断片群、上記②のプライマーを用いて調製したcDNA断片群、上記③のプライマーを用いて調製したcDNA断片群、及び上記④のプライマーを用いて調製したcDNA断片群の4種類のcDNA断片群を調製した。同様に、他の各組織についても各4種類にcDNA断片群を調製した。

【0095】実施例3 内臓脂肪組織に有意に発現の見られる遺伝子の同定

実施例1で被験試料として用いたヒト内臓組織及び他の種々組織での遺伝子の発現状態を、ディファレンシャルディスプレイ法 (Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 18, p. 4272-4280, 1993年; 及びScience, Vol. 257, p. 967-971, 1992; Genomics, Vol. 36, p. 316-319, 1996)、並びにRT-PCR法 (Reverse transcription-polymerase chain reaction; 実験医学・増刊、「PCRとその応用」、第8巻、第9号、1990年; 及び「遺伝子増幅PCR法・基礎と新しい展開」、共立出版株式会社発行、1992年) を用いて常法に従って解析し、該種々の組織での遺伝子の発現状態と比較して、内臓脂肪組織に有意に発現が見られる遺伝子を同定した。

【0096】ディファレンシャルディスプレイ法でのPCRで使用するテンプレートは、G3PDH (グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ) のcDNAの発現状態を対照として、実施例2で調製した各組織由来のcDNAを100~300倍に希釈し各サンプルを通じて濃度を一定に調製したものをを用いた。該テンプレートcDNA（各々2 μ l）に、蒸留水 (10.75 μ l)、10x EX Taq緩衝液 (2 μ l)、25 μ MのdNTP (1.5 μ l)、下記の各組み合わせのアービタリープライマー (arbitrary primer、

1 μ l、濃度：25pmol/ μ l)とアンカープライマー(実施例2で用いたものと同じ、1 μ l、濃度：25pmol/ μ l)、並びにEX Taq DNAポリメラーゼ(0.25 μ l)、及び $[\alpha^{35}\text{S}]$ dATP(1.5 μ l、10mCi/ml、アマシヤム製)とを加え全量を20 μ lとし、PCRを行った。即ち、各組織につき4種類のcDNA断片群が存在し、また3種類のアービタリープライマーを用いることから、各組織について12通りのPCRを行った。

【0097】(1)実施例2で①のアンカープライマーを用いて調製されたcDNA断片群に対して、アービタリープライマーとしてTGGTAAAGGG、GCATCGTCTA若しくはACTCGACCAGのいずれかと、アンカープライマーとして前記①のプライマー混合物との組み合わせ。

(2)実施例2で②のアンカープライマーを用いて調製されたcDNA断片群に対して、アービタリープライマーとしてTGGTAAAGGG、GCATCGTCTA若しくはACTCGACCAGのいずれかと、アンカープライマーとして前記②のプライマー混合物との組み合わせ。

(3)実施例2で③のアンカープライマーを用いて調製されたcDNA断片群に対して、アービタリープライマーとしてTGGTAAAGGG、GCATCGTCTA若しくはACTCGACCAGのいずれかと、アンカープライマーとして前記③のプライマー混合物との組み合わせ。

(4)実施例2で④のアンカープライマーを用いて調製されたcDNA断片群に対して、アービタリープライマーとしてTGGTAAAGGG、GCATCGTCTA若しくはACTCGACCAGのいずれかと、アンカープライマーとして前記④のプライマー混合物との組み合わせ。

【0098】該PCRは、94℃で3分間、40℃で5分間及び72℃で5分間からなる反応を1サイクル、94℃で30秒間、40℃で2分間及び72℃で1分間からなる反応を40サイクル、並びに72℃で5分間の反応を行った後、4℃に保持した。得られた各々のPCR産物に、反応停止緩衝液(stop buffer、5 μ l、<組成>：ホルムアミド(30ml)、キシレンシアノール(30mg)、プロモフェノールブルー(10mg)、0.5MのEDTA(200 μ l、pH8.0))を加えた後、3.5 μ lを分取し、6%アクリルアミドゲル(組成：500ml中に尿素(240g)、10x TBE(50ml)、40%アクリルアミド(75ml、38%モノアクリルアミド及び2%ビスアクリルアミドの混合物))を用いてシーケンスゲル電気泳動を行った。次いで、ゲルを乾かし、写真フィルムに転写した。この結果、他の組織試料に比べ、内臓脂肪組織や乳腺などの脂肪組織試料の電気泳動ゲルにおいてのみ特徴的に見られる3種類の遺伝子(cDNA)断片のバンドを同定した。該3つのcDNA断片をゲルから切り出し、常法(実験医学・別冊、「遺伝子工学ハンドブック」、羊土社発行、1992年)に従って、pBluescript SK(-)ベクターにクローニングした。次いで、DNAシーケンサーにより配列解析を行った。各々配列番号10(250bp)、配列番号11(230b

p)及び配列番号12(764bp)に記載される塩基配列を有していた。既存の遺伝子データベース(DBJ、GenBank及びEMBL)に基づく相同性検索の結果、いずれのcDNA断片も既知の塩基配列と相同性を有しない全く新規な配列を有することが判明した。該cDNA断片を、各々クローンAG1102(配列番号10)、AA3901(配列番号11)及びAA3401(配列番号12)と命名した。

【0099】実施例4 各cDNA断片の塩基配列に対応するmRNAの各種組織での発現の確認
得られた3つのcDNA断片の塩基配列に対応するmRNAのヒトの種々組織での発現状態を、得られた各々のcDNA断片をプローブとして用い、またHuman Multiple Tissue Northern Blot(Clontech製、コード：#7760-1、#7759-1)に添付の実験操作法及び常法に従って、ノーザンブロットング法により確認した。

【0100】ノーザンブロットングに用いるpoly(A)⁺RNAブロットング膜は、市販品又は別に調製したものを用いた。ヒトの心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、及び末梢白血球に由来するpoly(A)⁺RNAブロットング膜(各2 μ gのpoly(A)⁺RNAがブロットングされている)は、Clontech社より購入した。ヒトの胃、子宮及び乳腺については、Clontech社より購入したpoly(A)⁺RNA(各2 μ g)を、常法に従いアガロースゲル電気泳動に供し、ナイロン膜にブロットングしたものを用いた。また、ヒト内臓脂肪組織については、実施例1で取得した内臓脂肪組織由来のpoly(A)⁺RNA(2 μ g)を、同様にアガロースゲル電気泳動に供し、ナイロン膜にブロットングしたものを用いた。各々のpoly(A)⁺RNAブロットング膜に、 $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTPで標識した前記各々のcDNA断片をハイブリダイズさせた後、膜を洗浄しオートラジオグラフィー(-80℃、8時間)に供した。結果を図1乃至図3に示す。この結果、クローンAG1102のcDNA断片の塩基配列に対応するmRNAは、子宮及び卵巣乳腺等の女性臓器組織、乳腺、並びに内臓脂肪組織で有意な発現が見られた。また、その大きさは約3.3kbと認められた(図1)。クローンAA3901のcDNA断片の塩基配列に対応するmRNAは、内臓脂肪組織及び脾臓で有意な発現が見られ、また脾臓での発現は特に顕著であった。また、その大きさは約1.8kbと認められた(図2)。クローンAA3401のcDNA断片の塩基配列に対応するmRNAは、内臓脂肪組織で有意な発現が見られた。また、その大きさは約4.4kbと認められた(図3)。

【0101】実施例5 完全長cDNAの取得
実施例3で得られた3つのヒトcDNA断片(AG1102、AA3901、AA3401)をプローブとして用い、ブランクハイブリダイゼーション法(マニアティス(Maniatis)ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)、またはコロニーハイブリダイゼーション法を用い

て常法（実験医学・別冊、「遺伝子工学ハンドブック」、羊土社発行、1992年）により、ヒトcDNAライブラリーをスクリーニングして、各々のcDNA断片の塩基配列を含む完全長cDNAを取得した。なお、クローンAG1102についてはブラックハイブリダイゼーション法を用い、クローンAA3901及びAA3401についてはコロニーハイブリダイゼーション法を用いた。

【0102】<5-1> AG1102タンパクをコードする完全長cDNAのクローニング
ヒト乳腺の全RNAから精製されたpoly (A)⁺RNA (Clontech製、5 µg) を鋳型とし、ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene製) を用い、該キットに添の実験操作方法に従ってcDNAを合成した。得られたcDNAを、該キットに添付の実験操作説明書に記載の方法に従いUni-ZAP XRベクター (Stratagene製) に連結した。次いで、GIGA PACK II GOLD (Stratagene社製) を用いてインビトロパッケージングした後、得られたファージ粒子を用いて、大腸菌XL-1 Blue MRF' (GIGA PACK II GOLD, Stratagene社製) を宿主として、組み換えファージを含有するブラックからなるcDNAライブラリーを作製した。

【0103】cDNAライブラリーのスクリーニング
は、ブラックハイブリダイゼーション法に従い下記のようにして行った。cDNAライブラリー (1×10⁶個ブラック) を寒天プレートに蒔き、ナイロン膜 (Biodyne A, Poll社製) を用いてレプリカを作製した。実施例3で得たクローンAG1102のcDNA断片を[α-³²P]dCTPで標識し、ハイブリダイゼーション溶液 (7%PEG-8000及び10%SDS、Sigma製) を用いて濃度を1×10⁶cpm/mlに調整し、ブラックハイブリダイゼーション用プローブ溶液とした。このプローブ溶液を用いて、ブラックハイブリダイゼーション法により、該レプリカの1次スクリーニング及び2次スクリーニングを行い、10個のポジティブ・クローンを得た。各クローンをシングルブラックで単離した後、Stratagene社のマニュアルに従ってインビボエクシジョン (in vivo Excision) に供し、10クローンをプラスミドDNA (pBluescriptSK(-)) として回収した。

【0104】10個のクローン各々について、Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer製) を用いてダイジデオキシ法により塩基配列を決定した。その結果、最も長いDNAインサートを有するクローンは、3,171bp (poly(A)配列を除く) であり、また699個のアミノ酸からなるタンパクをコードする2,097bpのオープンリーディングフレーム (open reading frame) を含んでいた。全長cDNA配列 (5' 及び3' 末端塩基配列を含む) を配列番号1に、またその配列から演繹されるアミノ酸配列を配列番号2に示す。AG1102タンパクの推定アミノ酸配列に基づき、SMARTプログラム (Protein Sci., Vol. 5, p. 1991-1999, 1996) を用いてPROSITEデータベース (Nucleic Acids Res., Vol. 25, p. 217-221, 1997) を検索し、AG1102タンパクが既知のモチーフ (既知タンパクに見られる

特徴的構造) を有するか否かを解析したところ、下記①乃至③の特徴的な構造が含まれていることが明かとなった (図4)。

【0105】①シグナル配列 (配列番号2のアミノ酸番号1~16番目)。

①細胞間接着において重要な配列であり、接着分子であるインテグリン並びに細胞間接着において重要な役割を果たす細胞外マトリックス (ECM) 分子であるコラーゲン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン及びビトロネクチン等に共通して見られる特徴的な配列であるArg-Gly-Asp (RGD) 配列 (配列番号2のアミノ酸番号294~296番目)。

②蛋白複合体の形成に関与するフォンビルブランド因子C様ドメイン (Von Willebrand factor C (VWFC) domain) (配列番号2のアミノ酸番号121~157番目)。

③細胞内シグナル伝達、細胞間接着、細胞分化、DNA修復及びRNAのプロセッシングなどの種々の機能に関与すると考えられ、G蛋白共役型受容体、ECM分子、チロシンキナーゼ受容体及び神経成長因子などに共通して見られる特徴的な構造、即ち、ロイシン、イソロイシン及びバリン等の疎水性アミノ酸が繰返し出現するロイシンリッチリピート (Leucine-rich Repeat) と呼ばれる構造 (配列番号2のアミノ酸番号345~699番目)。また、既存の遺伝子データベース (DDBJ, GenBank及びEMBL) に基づく相同性検索の結果、AG1102タンパクは、マウス骨プロテオグリカンII前駆体 (mouse bone proteoglycan II precursor; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 83, p. 7683-7687, 1986)、ウシのケラトカン (Keratokan; J. Biol. Chem., Vol. 271, p. 9759-9763, 1996)、及びラットのデコリン (Decorin; Eur. J. Cell. Biol., Vol. 59, p. 314-321, 1992) と各々33.7%、33.2%及び33.0%のアミノ相同性を有していた。

【0106】<5-2> AA3901タンパクをコードする完全長cDNAのクローニング

ヒトcDNAライブラリーとしてヒト内臓脂肪組織から調製したpoly(A)⁺RNAを基に、既報のオリゴ・キャッピング法 (Gene, Vol. 138, p. 171-174, 1994; Gene, Vol. 200, p. 149-156, 1997) によりヒトcDNAライブラリーを作製した。また、前記実施例<5-1>と同様に、実施例3で得たクローンAA3901のcDNA断片を[α-³²P]dCTPで標識し、コロニーハイブリダイゼーション用プローブとした。このプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーション法に従い、下記のようにして前記cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。

【0107】cDNAライブラリー (6×10⁵個ブラック) を寒天プレートに蒔き、ナイロン膜 (Biodyne A, Poll社製) を用いてレプリカを作製した。このレプリカとコロニーハイブリダイゼーション用プローブとを用いて、ハイブリダイゼーション溶液 (7%PEG-8000及び10%SDS、Sigma製) 中でコロニーハイブリダイゼーションを行っ

た。1次スクリーニング及び2次スクリーニングを行い、2個のポジティブ・クローンを得た。各クローンをシングルコロニーとして単離した後、プラスミドDNAとして回収した。該2個のクローンについて前記<5-1>と同様にして塩基配列を決定した。その結果、最も長いDNAインサートを有するクローンは、1,577bp (poly(A)配列を除く)であり、また364個のアミノ酸からなるタンパクをコードする1,092bpのオープンリーディングフレーム (open reading frame) を含んでいた。全長cDNA配列 (5' 及び3' 末端塩基配列を含む) を配列番号3に、またその配列から演繹されるアミノ酸配列を配列番号4に示す。AA3901タンパクの推定アミノ酸配列に基づき、SMARTプログラム (Protein Sci., Vol.5, p.1991-1999, 1996) を用いてPROSITEデータベース (Nucleic Acids Res., Vol.25, p.217-221, 1997) を検索し、AA3901タンパクが既知のモチーフ (既知タンパクに見られる特徴的構造) を有するか否かを解析したところ、シグナル配列だけでなく、既知のいずれのモチーフも有しないものと考えられた。

【0108】<5-3> AA3401タンパクをコードする完全長cDNAのクローニング
コロニーハイブリダイゼーション用プローブとして実施例3で得たクローンAA3401のcDNA断片を [α -³²P]dCTPで標識した標識cDNAを用いる以外は、前記<5-2>とほぼ同様にしてクローニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションによる1次スクリーニング及び2次スクリーニングを行い、14個のポジティブ・クローンを得た。各クローンをシングルコロニーで単離した後、プラスミドDNAとして回収した。14個の各クローンについて<5-2>と同様にして塩基配列を決定した。その結果、最も長いDNAインサートを有するクローンは、4,029bp (poly(A)配列を除く)であり、また944個のアミノ酸からなるタンパクをコードする2,832bpのオープンリーディングフレーム (open reading frame) を含んでいた。全長cDNA配列 (5' 及び3' 末端塩基配列を含む) を配列番号5に、またその配列から演繹されるアミノ酸配列を配列番号6に示す。

【0109】AA3401タンパクの推定アミノ酸配列に基づき、SMARTプログラム (Protein Sci., Vol.5, p.1991-1999, 1996) を用いてPROSITEデータベース (Nucleic Acids Res., Vol.25, p.217-221, 1997) を検索し、AA3401タンパクが既知のモチーフ (既知タンパクに見られる特徴的構造) を有するか否かを解析したところ、シグナル配列だけでなく、既知のいずれのモチーフも有しないものと考えられた。また、既存の遺伝子データベース (DDBJ, GenBank及びEMBL) に基づく相同性検索の結果、AA3401タンパクは、ヒトのendosome-associated protein (J. Biol. Chem., Vol.270, p.13503-13511, 1995) 及びニワトリのミオシン重鎖 (myosin heavy chain; J. Mol. Biol., Vol.198, p.143-157, 1987) の α ヘリックス

(α -helix; coiled-coil structure) 部分と各々21.6%及び22.6%のアミノ相同性を有していた。従って、AA3401タンパクは、部分的 (配列番号6のアミノ酸番号370~944の領域中) に α ヘリックス構造を有すると予測される。

【0110】実施例6 ヒトゲノミックDNAのクローニング

前記実施例でクローニングしたヒトAG1102タンパク、AA3901タンパク及びAA3401タンパクをコードする各々の完全長cDNAをハイブリダーゼーションプローブとして用い、ヒトAG1102タンパク、AA3901タンパク及びAA3401タンパクをコードするゲノミックDNAを、ヒトゲノミックDNAライブラリーからスクリーニングした。なお、ヒトAG1102タンパクをコードするゲノミックDNAについては、ヒトゲノミックDNA含有ファージライブラリー (Stratagene製) を用いた。また、ヒトAA3901タンパク及びAA3401タンパクをコードするゲノミックDNAについては、下記のようにして作製したヒトゲノミックDNA含有コスミドライブラリーを用いた。

【0111】<6-1> ヒトゲノミックDNA含有コスミドライブラリーの作製

本発明で用いたコスミドライブラリーは、「ラボマニュアルヒトゲノムマッピング」 (堀雅明、中村祐輔 編、丸善 出版、第41~48頁) に従って作製した。以下その方法を簡単に示す。コスミドベクターpWE15 (Wahl, GM., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.84, 2160-2164, 1987) のBamHI部位を、Klenow酵素を用いてフィルイン (fillin) し、オリゴヌクレオチドリンカー (5'-CCTCGAGG-3') を用いてXhoIに変換し、改変コスミドベクターpWEX15を構築した。該ベクターを、XhoIで消化した後、クレノウ酵素、dCTP及びdTTPを用いて部分的にフィルインした。

【0112】ヒト染色体ゲノムDNAをSau3AIで消化した後、シュクロース濃度勾配遠心により画分し、ゲノムDNA断片を得た。該DNA断片を、クレノウ酵素、dATP及びdGTPを用いてフィルインした。該ベクターDNA (1 μ g) 及び該ゲノムDNA (1 μ g) を、10 \times ライゲーションバッファー (トリス塩酸 (0.5M (pH 7.5))、100mMの塩化マグネシウム、100mMジチオスレイトール、500 μ g/mlウシ血清アルブミン)、20mMのATP、50%ポリエチレングリコール8000、1M塩化ナトリウム、T4DNAリガーゼ (Boehringer製) 及び蒸留水の混合溶液中で連結させた。次いで、GIGAPACK II GOLD (Stratagene製) を用いて、インビトロパッケージングした。

【0113】<6-2> ヒトゲノミックDNAのクローニング

実施例5でクローニングしたヒトAG1102タンパク、AA3901タンパク及びAA3401タンパクをコードする各々の完全長cDNAを [α -³²P]dCTPで標識してハイブリダイゼーション

ンプローブとして用い、ブランクハイブリダイゼーション法またはコロニーハイブリダイゼーション法により、実施例5と同様にして、前記<6-1>で作製したヒトゲノミックDNA含有ファージライブラリーまたはヒトゲノミックDNA含有コスミドライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを得た。AG1102タンパク、AA3901タンパク及びAA3401タンパクの各々のゲノミックDNAのスクリーニングについて、各々2個、2個、及び6個の陽性クローンを得た。各々の陽性クローン中に含まれるヒトゲノミックDNAの塩基配列をDNAシーケンサーを用いて常法に従って解析し、各クローンのゲノミックDNA配列中に実施例5でクローニングしたAG1102タンパク、AA3901タンパクまたはAA3401タンパクの完全長cDNAに対応する塩基配列が含まれていることを確認した。このことから、得られた遺伝子が偽遺伝子 (Pseudogene) ではないことが確認された。

【0114】実施例7 遺伝子の染色体上の局在の解析 FISH法 (Fluorescence in situ hybridization; 実験医学・別冊、「遺伝子工学ハンドブック」、羊土社発行、1992年、第271頁～第277頁)を用いて、常法によりAG1102ゲノミックDNA、AA3901ゲノミックDNA及びAA3401ゲノミックの各々のヒト染色体上の局在を分析した。実施例6でクローニングしたAG1102タンパク、AA3901タンパク及びAA3401タンパクの各々をコードする各々のゲノミックDNAをプローブとして用いた。Rバンド法 (Hum. Genet., Vol. 86, p. 14-16, 1990)により染色体を分染するために、チミジンシンクロナイゼーション法 (thymidine synchronization) 及びプロモデオキシウリジン放出法 (bromodeoxyuridine release)を用いて、ヒト細胞分裂中期染色体 (metaphase chromosome)を調製した。

【0115】ハイブリダイゼーションを行う前に、細胞分裂中期ヒト細胞をHoechst-33258 (1 µg/ml)で染色し、紫外線照射を施した。該各々のプローブを、ニックトランスレーション法 (nick translation)によりピオチン-16-UTP (Boehringer製)で標識し、該変性中期細胞にハイブリダイズさせた。FITC-アビジン (fluorescein isothiocyanate-avidin; Boehringer製)を用いて、ハイブリダイゼーションシグナルを検出した。該シグナルの正確な測定は、複製したRバンドを可視的に確認することにより行った。この結果、AG1102遺伝子は複製Rバンド染色体標本上の9q22.3に、AA3901遺伝子は複製Rバンド染色体標本上の15q22に、またAA3401遺伝子は複製Rバンド染色体標本上の1p12及び1q21.1にマッピングされた (図5(a)、図6(a)及び図7)。AA3401遺伝子については、いずれか一方に局在していると考えられる。なお、細胞分裂中期ヒト細胞の染色体標本は、R分染核型上にマッピングした (図5(b)及び図6(b))。

【0116】

【発明の効果】本発明は、肥満及び/または肥満、特に

内臓型肥満に伴う合併症 (糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症、尿酸合成過剰に起因する高尿酸血症、睡眠時無呼吸症候群など)の発症に深く関与すると考えられている内臓に蓄積される脂肪組織、即ち内臓脂肪組織及び/または該組織の主要な構成細胞である脂肪細胞において産生が見られるタンパク分子及び該タンパクをコードする遺伝子に関するものである。即ち、本発明は、医薬品開発における下記のような有用性を有するタンパク; 該タンパクの一部; 該タンパク若しくはその一部をコードする遺伝子 (例えば、ゲノミックDNA、cDNA); 該遺伝子の一部 (アンチセンスDNAも含む); 該タンパク若しくはその一部に反応性を有する抗体 (例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体); 該抗体の一部、該遺伝子若しくはその一部を含む発現ベクター; 該ベクターで形質転換された形質転換細胞; 該抗体またはその一部を産生する細胞 (例えば、B細胞、ハイブリドーマ、組換え細胞); 該遺伝子、該遺伝子の一部、該タンパク、該タンパクの一部、該抗体若しくは該抗体の一部を含んでなる医薬組成物; 並びに、該タンパクに包含されるヒト由来のタンパクを体内に産生するように遺伝子工学的に作製されたトランスジェニックマウスを提供するものである。

【0117】本発明の遺伝子 (DNA) 若しくはその一部、タンパク若しくはその一部、並びに該タンパク若しくはその一部に体する抗体若しくはその一部は、各々下記に述べるように、内臓脂肪肥満、または内臓脂肪肥満に伴う合併症 (例えば、糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症、尿酸合成過剰に起因する高尿酸血症、及び睡眠時無呼吸症候群など)を予防及び/または治療するための医薬品として有用であり、また試験研究若しくは医薬品開発のためのツールとしても有用性である。

【0118】(1) 本発明の遺伝子 (DNA) によりコードされるタンパク分子の過剰発現が上記のような疾患の発症及び進行に対して促進的に働く場合

この場合には、該遺伝子あるいはタンパク若しくはその一部 (フラグメント) は、それらの疾患の治療及び予防のため薬剤開発のターゲットとすることができ、例えば、該遺伝子のmRNAへの転写を阻害する薬剤、該mRNAから本発明のタンパクへの翻訳を阻害する薬剤、該タンパクの生物活性を阻害する薬剤、該タンパクの産生を抑制する薬剤、あるいは該タンパクの受容体への結合若しくは他の分子との相互作用を阻害する薬剤などの薬剤設計、スクリーニングまたは活性測定 (アッセイ) のためのツールとして有用である。

【0119】例えば、該DNAは、そのような薬剤のスクリーニング及び活性測定 (アッセイ) において慣用される所謂レポーター遺伝子アッセイ (reporter gene assay) 並びに該レポーター遺伝子アッセイを原理としスクリーニングを機械を用いて自動で行う所謂ハイスループットスクリーニングにおいて極めて有用である。

【0120】前述の本発明のDNA（遺伝子）のmRNAへの転写を阻害する薬剤または該mRNAから本発明のタンパクへの翻訳を阻害する薬剤としては、アンチセンス医薬品をあげることができる。即ち、本発明のDNA配列または該配列に対応するmRNA配列を基にアンチセンスDNAまたはアンチセンスRNAを設計することが可能であり、該アンチセンスDNA及びアンチセンスRNAは、各々該アンチセンス配列と相補的な配列を有するDNAまたはmRNAに結合することにより、DNAからmRNAへの転写または該mRNAからタンパクへの翻訳を阻害するメカニズムによるアンチセンス医薬品として有用である。

【0121】前述の本発明のタンパクの生物活性を阻害する薬剤、該タンパクの産生を抑制する薬剤、あるいは該タンパクの受容体への結合若しくは他の分子との相互作用を阻害する薬剤としては、ペプチドアンタゴニスト、抗体あるいは低分子化合物をあげることができる。即ち、本発明のタンパクのアミノ酸配列を基にペプチドアンタゴニストを設計することができ、該ペプチドアンタゴニストは、本発明のタンパクの他の分子（例えば、受容体、リガンド）への結合を競合的に阻害することにより、本発明のタンパクが該分子との結合によって発生させるシグナルあるいは二次反応を阻害し、間接的に本発明のタンパクの生物学的機能が発揮されないようにする医薬品として有用である。また、本発明のタンパクまたはその一部に対する抗体（特に、モノクローナル抗体）は、本発明のタンパクに結合することにより該タンパクの生物活性の発揮を阻害（中和）することによる抗体医薬品として有用である。

【0122】（2）本発明の遺伝子（DNA）によりコードされるタンパク分子の発現が上記のような疾患の発症及び進行に依存して増大し、該タンパク分子が、該疾患の発症及び進行に対して抑制的に働く場合
この場合には、本発明のタンパクまたはその一部（例えば、その生物活性領域）自体が、医薬品として有用である。また、本発明の遺伝子（DNA）は、遺伝子治療により患者に投与することができそれ自体医薬品として有用である。さらに、前記（1）の場合と同様に、本発明の

DNA（遺伝子）あるいはタンパク若しくはその一部（フラグメント）は、それらの疾患の治療及び予防のため薬剤開発のターゲットとすることができ、例えば、該タンパクの産生を誘導／促進する低分子薬剤などの薬剤設計、スクリーニングまたは活性測定（アッセイ）のためのツールとして有用である。例えば、該DNAは、前記

（1）と同様に、そのような薬剤のスクリーニング及び活性測定（アッセイ）において慣用される所謂レポータージーンアッセイ並びに該レポータージーンアッセイを原理としスクリーニングを機械を用いて自動で行う所謂ハイスループットスクリーニングにおいて極めて有用である。

【0123】上記（1）及び（2）に加え、本発明の遺伝子（DNA）、タンパク、及び抗体は、本発明のタンパクと相互作用を有するタンパク（受容体及びリガンド）の探索、該リガンドの機能の解明、並びに該リガンドをターゲットとした医薬品開発における試験研究試薬として有用である。また、本発明のDNA態様の1つであるヒト由来のDNAをマウス等のヒト以外の哺乳動物に導入することによりモデル動物としてのトランスジェニック動物を作製することができる。同様に、本発明のDNAの態様に包含されるウサギあるいはマウス由来のDNAの遺伝子情報をもとに、それらに対応する内在性遺伝子を破壊（不活性化）することによりモデル動物（ノックアウト動物）を作成することが可能である。これらのモデル動物の物理学的、生物学的、病理学的及び遺伝子的特徴を分析することにより、本発明に係る遺伝子及びタンパクの機能を解明することが可能となる。

【0124】さらに、そのようにして内在性遺伝子が破壊された該モデル動物と該トランスジェニック動物を交配することにより、本発明のヒト由来遺伝子（DNA）のみを有するモデル動物を作成することが可能である。このモデル動物に、該導入されたヒト遺伝子をターゲットとした薬剤（化合物、抗体等）を投与することにより、その薬剤の治療学的効果を評価することが可能となる。

【0125】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>; Japan Tobacco, Inc.
<120>; Tissue specific mammalian-derived physiologically active protein
<130>; J98-0108
<140>;
<141>;
<160>; 12
<170>; PatentIn Ver. 2.0
<210>; 1
<211>; 3211
<212>; DNA
<213>; Homo sapiens

```

<;220>;
<;221>; 5' UTR
<;222>; (1).. (73)
<;220>;
<;221>; sig_peptide
<;222>; (74).. (124)
<;220>;
<;221>; CDS
<;222>; (74).. (2173)
<;220>;
<;221>; repeat_region
<;222>; (1105).. (2170)
<;220>;
<;221>; polyA_signal
<;222>; (3154).. (3159)
<;220>;
<;221>; 3' UTR
<;222>; (2174).. (3211)
<;400>; 1
ggcaccgagat gacaccaagc aaagcctact tagtttagat ctccagaaat tggetggtgg 60
aaaaaaaaatca aac atg aag att gca gtt ttg ttt tgt ttt ttt ctg ctt 109
Met Lys Ile Ala Val Leu Phe Cys Phe Phe Leu Leu
      1             5             10
atc att ttt caa act gac ttt gga aaa aat gaa gaa att cct agg aag 157
Ile Ile Phe Gln Thr Asp Phe Gly Lys Asn Glu Glu Ile Pro Arg Lys
      15             20             25
caa agg agg aag atc tac cac aga agg ttg agg aaa agt tca acc tca 205
Gln Arg Arg Lys Ile Tyr His Arg Arg Leu Arg Lys Ser Ser Thr Ser
      30             35             40
cac aag cac aga tca aac aga cag ctt gga att cag caa aca aca gtt 253
His Lys His Arg Ser Asn Arg Gln Leu Gly Ile Gln Gln Thr Thr Val
      45             50             55             60
ttt aca cca gta gca aga ctt cct att gtt aac ttt gat tat agc atg 301
Phe Thr Pro Val Ala Arg Leu Pro Ile Val Asn Phe Asp Tyr Ser Met
      65             70             75
gag gaa aag ttt gaa tcc ttt tca agt ttt cct gga gta gaa tca agt 349
Glu Glu Lys Phe Glu Ser Phe Ser Phe Pro Gly Val Glu Ser Ser
      80             85             90
tat aat gtg tta cca gga aag aag gga cac tgt ttg gta aag ggc ata 397
Tyr Asn Val Leu Pro Gly Lys Lys Gly His Cys Leu Val Lys Gly Ile
      95             100            105
acc atg tac aac aaa gct gtg tgg tgg cct gag ccc tgc act acc tgc 445
Thr Met Tyr Asn Lys Ala Val Trp Ser Pro Glu Pro Cys Thr Thr Cys
      110            115            120
ctc tgc tca gat gga aga gtt ctt tgt gat gaa acc atg tgc cat ccc 493
Leu Cys Ser Asp Gly Arg Val Leu Cys Asp Glu Thr Met Cys His Pro
      125            130            135            140
cag agg tgc ccc caa aca gtt ata cct gaa ggg gaa tgc tgc ccg gtc 541
Gln Arg Cys Pro Gln Thr Val Ile Pro Glu Gly Glu Cys Cys Pro Val
      145            150            155

```


tgc tcc gct act gtc tcc tat tct cta ctc agt ggt ata gca tta aat	589
Cys Ser Ala Thr Val Ser Tyr Ser Leu Leu Ser Gly Ile Ala Leu Asn	
160 165 170	
gat aga aat gaa ttt tct ggt gat tct tca gaa caa aga gaa cct acc	637
Asp Arg Asn Glu Phe Ser Gly Asp Ser Ser Glu Gln Arg Glu Pro Thr	
175 180 185	
aat tta ctt cat aag caa ctg cca cct cct cag gtg gga atg gac cga	685
Asn Leu Leu His Lys Gln Leu Pro Pro Pro Gln Val Gly Met Asp Arg	
190 195 200	
ata gta aga aaa gaa gca ctt caa tct gag gag gat gaa gaa gtg aaa	733
Ile Val Arg Lys Glu Ala Leu Gln Ser Glu Glu Asp Glu Glu Val Lys	
205 210 215 220	
gaa gaa gat aca gag caa aag aga gag acc cct gaa tct aga aat cag	781
Glu Glu Asp Thr Glu Gln Lys Arg Glu Thr Pro Glu Ser Arg Asn Gln	
225 230 235	
ggg caa ctt tac agt gag ggg gac agc aga gga gga gac aga aag cag	829
Gly Gln Leu Tyr Ser Glu Gly Asp Ser Arg Gly Gly Asp Arg Lys Gln	
240 245 250	
agg cct gga gag gag agg agg ctg gca cac cag caa caa cgc caa gga	877
Arg Pro Gly Glu Glu Arg Arg Leu Ala His Gln Gln Gln Arg Gln Gly	
255 260 265	
agg gag gag gag gag gat gag gag gag gag ggt gag gag ggt gag gag	925
Arg Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Gly Glu Glu Gly Glu Glu	
270 275 280	
gat gag gag gac gag gag gac ccg gta aga gga gat atg ttc cga atg	973
Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Pro Val Arg Gly Asp Met Phe Arg Met	
285 290 295 300	
ccc tct cga tcc ccg ctt cct gct cct ccc aga ggc aca ctg cgc ctg	1021
Pro Ser Arg Ser Pro Leu Pro Ala Pro Pro Arg Gly Thr Leu Arg Leu	
305 310 315	
cca agc ggg tgc tct ctg tcc tac agg acc atc agc tgc atc aac gcc	1069
Pro Ser Gly Cys Ser Leu Ser Tyr Arg Thr Ile Ser Cys Ile Asn Ala	
320 325 330	
atg ctt acc cag ata cca ccg ctg aca gca cca cag ata aca agt ctg	1117
Met Leu Thr Gln Ile Pro Pro Leu Thr Ala Pro Gln Ile Thr Ser Leu	
335 340 345	
gag ctc act ggc aat tcc atc gcc tcc atc cca gat gaa gca ttt aat	1165
Glu Leu Thr Gly Asn Ser Ile Ala Ser Ile Pro Asp Glu Ala Phe Asn	
350 355 360	
gga tta cca aat ttg gaa agg ctt gat ctg agt aaa aat aat atc act	1213
Gly Leu Pro Asn Leu Glu Arg Leu Asp Leu Ser Lys Asn Asn Ile Thr	
tct tca ggc ata ggt cca aaa gca ttc aag ctt ctg aag aag tta atg	1261
Ser Ser Gly Ile Gly Pro Lys Ala Phe Lys Leu Leu Lys Lys Leu Met	
385 390 395	
cgt ttg aat atg gat gga aat aat ttg ata cag att cct tca caa ttg	1309
Arg Leu Asn Met Asp Gly Asn Asn Leu Ile Gln Ile Pro Ser Gln Leu	
400 405 410	
cca tct aca tta gaa gaa ctt aaa gtc aat gag aac aat ctt cag gct	1357

Pro Ser Thr Leu Glu Glu Leu Lys Val Asn Glu Asn Asn Leu Gln Ala	
415 420 425	
atc gat gaa gaa agt tta tca gac tta aat cag ttg gtc acc tta gaa	1405
Ile Asp Glu Glu Ser Leu Ser Asp Leu Asn Gln Leu Val Thr Leu Glu	
430 435 440	
ttg gaa gga aac aat ctc agt gaa gcc aat gtc aat cct tta gct ttc	1453
Leu Glu Gly Asn Asn Leu Ser Glu Ala Asn Val Asn Pro Leu Ala Phe	
445 450 455 460	
aaa cct ttg aag agc cta gcc tac ttg cgt ctg gga aaa aat aaa ttt	1501
Lys Pro Leu Lys Ser Leu Ala Tyr Leu Arg Leu Gly Lys Asn Lys Phe	
465 470 475	
aga att ata ccg cag ggt ctt cct ggt tct att gag gaa tta tac cta	1549
Arg Ile Ile Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Ile Glu Glu Leu Tyr Leu	
480 485 490	
gaa aat aac caa att gaa gaa ata act gaa att tgt ttc aat cat acc	1597
Glu Asn Asn Gln Ile Glu Glu Ile Thr Glu Ile Cys Phe Asn His Thr	
495 500 505	
aga aag atc aat gtc att gta cta cgt tat aac aaa att gaa gaa aat	1645
Arg Lys Ile Asn Val Ile Val Leu Arg Tyr Asn Lys Ile Glu Glu Asn	
510 515 520	
agg att gct cct tta gcc tgg ata aat caa gaa aat cta gaa tcc att	1693
Arg Ile Ala Pro Leu Ala Trp Ile Asn Gln Glu Asn Leu Glu Ser Ile	
525 530 535 540	
gat ctc tcc tac aac aag ctc tat cac gtc ccg tcc tat cta ccc aag	1741
Asp Leu Ser Tyr Asn Lys Leu Tyr His Val Pro Ser Tyr Leu Pro Lys	
545 550 555	
tcc ttg ctg cac cta gta ctc ctt ggg aac cag att gaa cgg atc cct	1789
Ser Leu Leu His Leu Val Leu Leu Gly Asn Gln Ile Glu Arg Ile Pro	
560 565 570	
ggc tat gtg ttt ggc cac atg gaa cca ggc ctg gaa tac ttg tac ctg	1837
Gly Tyr Val Phe Gly His Met Glu Pro Gly Leu Glu Tyr Leu Tyr Leu	
575 580 585	
tca ttt aac aaa ctt gct gat gat ggc atg gac cgt gtc tcc ttc tat	1885
Ser Phe Asn Lys Leu Ala Asp Asp Gly Met Asp Arg Val Ser Phe Tyr	
590 595 600	
ggg gca tat cat tct ctg aga gaa tta ttt ctg gat cac aat gac tta	1933
Gly Ala Tyr His Ser Leu Arg Glu Leu Phe Leu Asp His Asn Asp Leu	
605 610 615 620	
aaa tct ata cca cct ggg ata caa gaa atg aaa gca cta cat ttt ctg	1981
Lys Ser Ile Pro Pro Gly Ile Gln Glu Met Lys Ala Leu His Phe Leu	
625 630 635	
agg ctg aac aac aac aag ata cgg aac att ctt cca gaa gaa att tgc	2029
Arg Leu Asn Asn Asn Lys Ile Arg Asn Ile Leu Pro Glu Glu Ile Cys	
640 645 650	
aat gct gaa gag gat gat gac tca aat ctg gaa cat ctt cat ctt gaa	2077
Asn Ala Glu Glu Asp Asp Asp Ser Asn Leu Glu His Leu His Leu Glu	
655 660 665	
aac aat tat att aaa att aga gaa ata cca tct tac aca ttt tca tgc	2125

Asn Asn Tyr Ile Lys Ile Arg Glu Ile Pro Ser Tyr Thr Phe Ser Cys
670 675 680
ata aga tca tac tca agt atc gtt ctt aaa cca caa aac atc aag taa 2173
Ile Arg Ser Tyr Ser Ser Ile Val Leu Lys Pro Gln Asn Ile Lys
685 690 695 700
ttccaagttt tcctttgctg ttataaaact ttactcatgt atttgtagta gctgcatttg 2233
tcattaataa gagagacata atcctcctgt tatactcagt atcattatat gctagtcaac 2293
ctgattcact aacacacaga tgaacaacca aaatatacct aaaaggata gtctctagga 2353
gtttatttaa tagtaaaagt aaatctctc agtttctac ctctagaaag aggccatctc 2413
actagaatag gatattatgc atactgagct agaccagaag agtctggaac aaaataaaca 2473

cagcctttat aatcaacttg aatactgggtg ttagctgaga actctgtaag tccctttaaa 2533
aattatgtat cttttggttc aagattaaga agcataatga caacaaaaaa agcaggcaga 2593
atttatgaat aagtgttgtt tattattaaa acaataattt gttattttct tataaggccc 2653
tgtctataa ttactggtat aaatataact gaattatggg gtagctttca tttcttccat 2713
taattacatg tgtaaaatta aaacactact gtaattgtaa tttcctggtt ttgaaaatca 2773
tattatggtt atgtacattg ttaacattaa ggaaagctgg cagaagggtg tgcataaatt 2833
ctatactctt tttgaaactt ttctataatt ctaaaattat tttttaaagt taaacagtat 2893
attaagatta ccttcactat tcctcactca agattaagac attttttgaa aagcagtaga 2953
gtttgcttaa aatacaaat aattattctt gactataacc ttgtaaaggt aaatctaag 3013
tataaatttt tgaaaaattt tgcaccactg gtcatagcat ctatctcctt tgccttaatt 3073
tactgaaata catcatttta ttcggttcaa ttgaaataaa gctatgtctt tactatgtat 3133
tggccctacc aaaatcatat attaaaaatt tctaacataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3193
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3211

<;210>; 2

<;211>; 699

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 2

Met Lys Ile Ala Val Leu Phe Cys Phe Phe Leu Leu Ile Ile Phe Gln

1 5 10 15
Thr Asp Phe Gly Lys Asn Glu Glu Ile Pro Arg Lys Gln Arg Arg Lys
20 25 30

Ile Tyr His Arg Arg Leu Arg Lys Ser Ser Thr Ser His Lys His Arg
35 40 45

Ser Asn Arg Gln Leu Gly Ile Gln Gln Thr Thr Val Phe Thr Pro Val
50 55 60

Ala Arg Leu Pro Ile Val Asn Phe Asp Tyr Ser Met Glu Glu Lys Phe
65 70 75 80

Glu Ser Phe Ser Ser Phe Pro Gly Val Glu Ser Ser Tyr Asn Val Leu
85 90 95

Pro Gly Lys Lys Gly His Cys Leu Val Lys Gly Ile Thr Met Tyr Asn
100 105 110

Lys Ala Val Trp Ser Pro Glu Pro Cys Thr Thr Cys Leu Cys Ser Asp
115 120 125

Gly Arg Val Leu Cys Asp Glu Thr Met Cys His Pro Gln Arg Cys Pro
130 135 140

Gln Thr Val Ile Pro Glu Gly Glu Cys Cys Pro Val Cys Ser Ala Thr
145 150 155 160

Val Ser Tyr Ser Leu Leu Ser Gly Ile Ala Leu Asn Asp Arg Asn Glu
165 170 175
Phe Ser Gly Asp Ser Ser Glu Gln Arg Glu Pro Thr Asn Leu Leu His
180 185 190
Lys Gln Leu Pro Pro Pro Gln Val Gly Met Asp Arg Ile Val Arg Lys
195 200 205
Glu Ala Leu Gln Ser Glu Glu Asp Glu Glu Val Lys Glu Glu Asp Thr
210 215 220
Glu Gln Lys Arg Glu Thr Pro Glu Ser Arg Asn Gln Gly Gln Leu Tyr
225 230 235 240
Ser Glu Gly Asp Ser Arg Gly Gly Asp Arg Lys Gln Arg Pro Gly Glu
245 250 255
Glu Arg Arg Leu Ala His Gln Gln Gln Arg Gln Gly Arg Glu Glu Glu
260 265 270
Glu Asp Glu Glu Glu Glu Gly Glu Glu Gly Glu Glu Asp Glu Glu Asp
275 280 285

Glu Glu Asp Pro Val Arg Gly Asp Met Phe Arg Met Pro Ser Arg Ser
290 295 300
Pro Leu Pro Ala Pro Pro Arg Gly Thr Leu Arg Leu Pro Ser Gly Cys
305 310 315 320
Ser Leu Ser Tyr Arg Thr Ile Ser Cys Ile Asn Ala Met Leu Thr Gln
325 330 335
Ile Pro Pro Leu Thr Ala Pro Gln Ile Thr Ser Leu Glu Leu Thr Gly
340 345 350
Asn Ser Ile Ala Ser Ile Pro Asp Glu Ala Phe Asn Gly Leu Pro Asn
355 360 365
Leu Glu Arg Leu Asp Leu Ser Lys Asn Asn Ile Thr Ser Ser Gly Ile
370 375 380
Gly Pro Lys Ala Phe Lys Leu Leu Lys Lys Leu Met Arg Leu Asn Met
385 390 395 400
Asp Gly Asn Asn Leu Ile Gln Ile Pro Ser Gln Leu Pro Ser Thr Leu
405 410 415
Glu Glu Leu Lys Val Asn Glu Asn Asn Leu Gln Ala Ile Asp Glu Glu
420 425 430
Ser Leu Ser Asp Leu Asn Gln Leu Val Thr Leu Glu Leu Glu Gly Asn
435 440 445
Asn Leu Ser Glu Ala Asn Val Asn Pro Leu Ala Phe Lys Pro Leu Lys
450 455 460
Ser Leu Ala Tyr Leu Arg Leu Gly Lys Asn Lys Phe Arg Ile Ile Pro
465 470 475 480
Gln Gly Leu Pro Gly Ser Ile Glu Glu Leu Tyr Leu Glu Asn Asn Gln
485 490 495
Ile Glu Glu Ile Thr Glu Ile Cys Phe Asn His Thr Arg Lys Ile Asn
500 505 510
Val Ile Val Leu Arg Tyr Asn Lys Ile Glu Glu Asn Arg Ile Ala Pro
515 520 525
Leu Ala Trp Ile Asn Gln Glu Asn Leu Glu Ser Ile Asp Leu Ser Tyr
530 535 540
Asn Lys Leu Tyr His Val Pro Ser Tyr Leu Pro Lys Ser Leu Leu His

545 550 555 560
 Leu Val Leu Leu Gly Asn Gln Ile Glu Arg Ile Pro Gly Tyr Val Phe
 565 570 575
 Gly His Met Glu Pro Gly Leu Glu Tyr Leu Tyr Leu Ser Phe Asn Lys
 580 585 590
 Leu Ala Asp Asp Gly Met Asp Arg Val Ser Phe Tyr Gly Ala Tyr His
 595 600 605
 Ser Leu Arg Glu Leu Phe Leu Asp His Asn Asp Leu Lys Ser Ile Pro
 610 615 620
 Pro Gly Ile Gln Glu Met Lys Ala Leu His Phe Leu Arg Leu Asn Asn
 625 630 635 640
 Asn Lys Ile Arg Asn Ile Leu Pro Glu Glu Ile Cys Asn Ala Glu Glu
 645 650 655
 Asp Asp Asp Ser Asn Leu Glu His Leu His Leu Glu Asn Asn Tyr Ile
 660 665 670
 Lys Ile Arg Glu Ile Pro Ser Tyr Thr Phe Ser Cys Ile Arg Ser Tyr
 675 680 685
 Ser Ser Ile Val Leu Lys Pro Gln Asn Ile Lys
 690 695
 <;210>; 3
 <;211>; 1690
 <;212>; DNA
 <;213>; Homo sapiens
 <;220>;
 <;221>; 5' UTR
 <;222>; (1).. (129)

 <;220>;
 <;221>; CDS
 <;222>; (130).. (1224)
 <;220>;
 <;221>; polyA_signal
 <;222>; (1555).. (1560)
 <;220>;
 <;221>; 3' UTR
 <;222>; (1225).. (1690)
 <;400>; 3
 agtactgaag gtggcgctc ggcagcgggc tagaggccac tggcactgag cttgcaacca 60
 gatccagaga cactgaagaa gagagaaagg cgcacctctt cccgccactc ctagccccag 120
 cctccaagg atg cgg ctc ctc gag aaa ctc tgt tcc tcg gcc gca ggc agc 171
 Met Arg Leu Leu Glu Lys Leu Cys Ser Ser Ala Ala Gly Ser
 1 5 10
 tcc gcg ccg aag ccc gcc ttc gcc aaa gtg ctc acg ccg aat cgc atc 219
 Ser Ala Pro Lys Pro Ala Phe Ala Lys Val Leu Thr Pro Asn Arg Ile
 15 20 25 30
 ccc gaa ttc tgc atc ccg ccg cgg ctg ccg gcc cct tgc acg ctc ggg 267
 Pro Glu Phe Cys Ile Pro Pro Arg Leu Pro Ala Pro Cys Thr Leu Gly
 35 40 45

 tct cca atc cgg gcc gcc gcc gtg ccc cgg cgc tgc gcc gct gaa agc 315

Ser Pro Ile Arg Ala Ala Ala Val Pro Arg Arg Cys Ala Ala Glu Ser
 50 55 60
 gac ctg tgg ccc cgc gcg gca gac gag gac gcc ggc cgc acg gac tgg 363
 Asp Leu Trp Pro Arg Ala Ala Asp Glu Asp Ala Gly Arg Thr Asp Trp
 65 70 75
 gac ccg cgc tgc cag gca gcg ctg tca ctg ccg cac ctg ccc cgt gtg 411
 Asp Pro Arg Ser Gln Ala Ala Leu Ser Leu Pro His Leu Pro Arg Val
 80 85 90
 cgc acc acc tac ggc ttc tgc gcg ctg ctc gag agc ccg cac acg cgc 459
 Arg Thr Thr Tyr Gly Phe Cys Ala Leu Leu Glu Ser Pro His Thr Arg
 95 100 105 110
 cgc aag gag tgc ctc ctg ctc ggg ggc ccg ccc gcg ccc cgg ccc cgg 507
 Arg Lys Glu Ser Leu Leu Leu Gly Gly Pro Pro Ala Pro Arg Pro Arg
 115 120 125
 gcc cac agc tgc ggc ggc ggc gga ggc ccg gac gcc ccc ctg ggg acc 555
 Ala His Ser Cys Gly Gly Gly Gly Pro Asp Ala Pro Leu Gly Thr
 130 135 140
 ctg tgc ggc ccg cga ggt ccg ggc ccg gcc acc ccc gcg gcc ccc ggc 603
 Leu Cys Gly Pro Arg Gly Pro Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Gly
 145 150 155
 ggt ccc cgc ctg ccc cag gac gcg ctc gct gcg ggg ccc cgc cgc tgc 651
 Gly Pro Arg Leu Pro Gln Asp Ala Leu Ala Ala Gly Pro Arg Arg Cys
 160 165 170
 cgc ctc ctg cgc gtc ccc gac ggg ctg ctg agt cgc gcg ctg cgg gct 699
 Arg Leu Leu Arg Val Pro Asp Gly Leu Leu Ser Arg Ala Leu Arg Ala
 175 180 185 190
 gga agg agt cgc cgc ctg gcc cgc gtc cgc tcc gac tcc agc ggg aac 747
 Gly Arg Ser Arg Arg Leu Ala Arg Val Arg Ser Asp Ser Ser Gly Asn
 195 200 205
 gag gac gag gag cgc cgc gcg gga tcc gag tcc ccg gcc cgg gcc ccc 795
 Glu Asp Glu Glu Arg Arg Ala Gly Ser Glu Ser Pro Ala Arg Ala Pro
 210 215 220
 tcc tgc agc ccg ctg tca tcc agg gcc ccg ctt cct gag cgc ctg gag 843
 Ser Ser Ser Pro Leu Ser Ser Arg Ala Pro Leu Pro Glu Arg Leu Glu
 225 230 235
 gcc aag ggc acc gtg gct ctg ggc cgc gcc ggc gac gcc ctg cgc ctg 891
 Ala Lys Gly Thr Val Ala Leu Gly Arg Ala Gly Asp Ala Leu Arg Leu
 240 245 250
 gct gct gag tac tgt ccg gga acc cgg cgt ctc cgc ctc cgg ctg ctc 939
 Ala Ala Glu Tyr Cys Pro Gly Thr Arg Arg Leu Arg Leu Arg Leu Leu
 255 260 265 270
 cgc gcg gag agc ctg ttc gga ggc gcc ccc ggg ccc cgc gcc gtc cgc 987
 Arg Ala Glu Ser Leu Phe Gly Gly Ala Pro Gly Pro Arg Ala Val Arg
 275 280 285
 tgc cgc ctc agc ctc gtc ctg cgg ccg ccg ggc act gcg cgt tgg caa 1035
 Cys Arg Leu Ser Leu Val Leu Arg Pro Pro Gly Thr Ala Arg Trp Gln
 290 295 300
 tgc agc gct gtg gtg ggg cgc agc cgc aag gcc tcc ttt gac cag gac 1083
 Cys Ser Ala Val Val Gly Arg Ser Arg Lys Ala Ser Phe Asp Gln Asp
 305 310 315

ttt tgc ttc gac ggc ctc tcg gaa gac gag gtg cgc cgc ctg gcc gtt 1131
 Phe Cys Phe Asp Gly Leu Ser Glu Asp Glu Val Arg Arg Leu Ala Val
 320 325 330
 cgc gtc aag gcc cgg gat gag ggt cgc ggc cgg gat cgg ggc cgc ctg 1179
 Arg Val Lys Ala Arg Asp Glu Gly Arg Gly Arg Asp Arg Gly Arg Leu
 335 340 345 350
 ctg ggc cag ggt gag ctg tcc ctg ggc gcc ctc ctg ctg ctc tga 1224
 Leu Gly Gln Gly Glu Leu Ser Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu
 355 360 365
 ggccccagcc ctccccgggg cgtctgccc tggagactcc ggacactgac agccgcgtgg 1284
 tacagaataa acgttattta ttttttatt tatgatactg ctttattgac gttttacttc 1344
 ctcaccatcc acatttgtca tcgtctattg gtaaagaaga aaaagataat gactccctgt 1404
 tctgttcaca ggacccccat atctctttcc agaccatttt tgattccaa ggaaaaatgg 1464
 gttggcttgg gactgggaga gaaaggaagt acacccatct gcattgtttt taattccttc 1524
 cggttttcta tcaatgttac agtttttttt aataaagcaa gttattcatt cagaaaaaaa 1584
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1644
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1690
 <;210>; 4
 <;211>; 364
 <;212>; PRT
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 4
 Met Arg Leu Leu Glu Lys Leu Cys Ser Ser Ala Ala Gly Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Ala Phe Ala Lys Val Leu Thr Pro Asn Arg Ile Pro Glu
 20 25 30
 Phe Cys Ile Pro Pro Arg Leu Pro Ala Pro Cys Thr Leu Gly Ser Pro
 35 40 45
 Ile Arg Ala Ala Ala Val Pro Arg Arg Cys Ala Ala Glu Ser Asp Leu
 50 55 60
 Trp Pro Arg Ala Ala Asp Glu Asp Ala Gly Arg Thr Asp Trp Asp Pro
 65 70 75 80
 Arg Ser Gln Ala Ala Leu Ser Leu Pro His Leu Pro Arg Val Arg Thr
 85 90 95
 Thr Tyr Gly Phe Cys Ala Leu Leu Glu Ser Pro His Thr Arg Arg Lys
 100 105 110
 Glu Ser Leu Leu Leu Gly Gly Pro Pro Ala Pro Arg Pro Arg Ala His
 115 120 125
 Ser Cys Gly Gly Gly Gly Gly Pro Asp Ala Pro Leu Gly Thr Leu Cys
 130 135 140
 Gly Pro Arg Gly Pro Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Gly Gly Pro
 145 150 155 160
 Arg Leu Pro Gln Asp Ala Leu Ala Ala Gly Pro Arg Arg Cys Arg Leu
 165 170 175
 Leu Arg Val Pro Asp Gly Leu Leu Ser Arg Ala Leu Arg Ala Gly Arg
 180 185 190
 Ser Arg Arg Leu Ala Arg Val Arg Ser Asp Ser Ser Gly Asn Glu Asp
 195 200 205
 Glu Glu Arg Arg Ala Gly Ser Glu Ser Pro Ala Arg Ala Pro Ser Ser
 210 215 220

Ser Pro Leu Ser Ser Arg Ala Pro Leu Pro Glu Arg Leu Glu Ala Lys
 225 230 235 240
 Gly Thr Val Ala Leu Gly Arg Ala Gly Asp Ala Leu Arg Leu Ala Ala
 245 250 255
 Glu Tyr Cys Pro Gly Thr Arg Arg Leu Arg Leu Arg Leu Leu Arg Ala
 260 265 270
 Glu Ser Leu Phe Gly Gly Ala Pro Gly Pro Arg Ala Val Arg Cys Arg
 275 280 285
 Leu Ser Leu Val Leu Arg Pro Pro Gly Thr Ala Arg Trp Gln Cys Ser
 290 295 300
 Ala Val Val Gly Arg Ser Arg Lys Ala Ser Phe Asp Gln Asp Phe Cys
 305 310 315 320
 Phe Asp Gly Leu Ser Glu Asp Glu Val Arg Arg Leu Ala Val Arg Val
 325 330 335
 Lys Ala Arg Asp Glu Gly Arg Gly Arg Asp Arg Gly Arg Leu Leu Gly
 340 345 350
 Gln Gly Glu Leu Ser Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu
 355 360

<;210>; 5

<;211>; 4049

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;220>;

<;221>; 5' UTR

<;222>; (1).. (348)

<;220>;

<;221>; CDS

<;222>; (349).. (3183)

<;220>;

<;221>; polyA_signal

<;222>; (4008).. (4014)

<;220>;

<;221>; 3' UTR

<;222>; (3184).. (4049)

<;400>; 5

agtctgctaa aaggggagga cgttgaggac gcggcgctg gcgggagaga cagctgggga 60
 gagacatgac agggtcggag cgcgccctgc gcctctgtca ctcagcatcc tcttaggcgt 120
 ttccacgcc gccccctgcc cgagggcgcg ggctgacggc tctggtaccc ggagtcggcg 180
 cgcggggcag gggcgcgccc ctgcagagtg gggacccac tgggctgtgc catgctgacc 240
 ggagaccacc gaggcgggag acagagcgcg gcgaagagcc attgagtggc caccagtag 300

ccgcgcgcgc cgccgcctcg ggaagcttgc caccgctag gagggag atg aag gag 357

Met Lys Glu

1

att tgc agg atc tgt gcc cga gag ctg tgt gga aac cag cgg cgc tgg 405

Ile Cys Arg Ile Cys Ala Arg Glu Leu Cys Gly Asn Gln Arg Arg Trp

5

10

15

atc ttc cac acg gcg tcc aag ctc aat ctc cag gtt ctg ctt tcg cac 453

Ile Phe His Thr Ala Ser Lys Leu Asn Leu Gln Val Leu Leu Ser His

20

25

30

35

gtc ttg ggc aag gat gtc ccc cgc gat ggc aaa gcc gag ttc gct tgc 501
 Val Leu Gly Lys Asp Val Pro Arg Asp Gly Lys Ala Glu Phe Ala Cys
 40 45 50
 agc aag tgt gct ttc atg ctt gat cga atc tat cga ttc gac aca gtt 549
 Ser Lys Cys Ala Phe Met Leu Asp Arg Ile Tyr Arg Phe Asp Thr Val
 55 60 65
 att gcc cgg att gaa gcg ctt tct att gag cgc ttg caa aag ctg cta 597
 Ile Ala Arg Ile Glu Ala Leu Ser Ile Glu Arg Leu Gln Lys Leu Leu
 70 75 80
 ctg gag aag gat cgc ctc aag ttc tgc att gcc agt atg tat cgg aag 645
 Leu Glu Lys Asp Arg Leu Lys Phe Cys Ile Ala Ser Met Tyr Arg Lys
 85 90 95
 aat aac gat gac tct ggc gcg gag atc aag gcg ggg aat ggg acg gtt 693
 Asn Asn Asp Asp Ser Gly Ala Glu Ile Lys Ala Gly Asn Gly Thr Val
 100 105 110 115
 gac atg tcc gtc tta ccc gat gcg aga tac tct gca ctg ctc cag gag 741
 Asp Met Ser Val Leu Pro Asp Ala Arg Tyr Ser Ala Leu Leu Gln Glu
 120 125 130
 gac ttc gcc tat tca ggg ttt gag tgc tgg gtg gag aat gag gat cag 789
 Asp Phe Ala Tyr Ser Gly Phe Glu Cys Trp Val Glu Asn Glu Asp Gln
 135 140 145
 atc cag gag cca cac agc tgc cat ggt tca gaa gcc cct gga aac cga 837
 Ile Gln Glu Pro His Ser Cys His Gly Ser Glu Gly Pro Gly Asn Arg
 150 155 160
 ccc agg aga tgc cgt ggt tgt gcc gct ttg cgg gtt gct gat tct gac 885
 Pro Arg Arg Cys Arg Gly Cys Ala Ala Leu Arg Val Ala Asp Ser Asp
 165 170 175
 tat gaa gcc att tgt aag gta cct cga aag gtg gcc aga agt atc tcc 933
 Tyr Glu Ala Ile Cys Lys Val Pro Arg Lys Val Ala Arg Ser Ile Ser
 180 185 190 195
 tgc ggc cct tct agc agg tgg tcg acc agc att tgc act gaa gaa cca 981
 Cys Gly Pro Ser Ser Arg Trp Ser Thr Ser Ile Cys Thr Glu Glu Pro
 200 205 210
 gcg ttg tct gag gtt ggg cca ccc gac tta gca agc aca aag gta ccc 1029
 Ala Leu Ser Glu Val Gly Pro Pro Asp Leu Ala Ser Thr Lys Val Pro
 215 220 225
 cca gat gga gaa agc atg gag gaa gag acg cct ggt tcc tct gtg gaa 1077
 Pro Asp Gly Glu Ser Met Glu Glu Glu Thr Pro Gly Ser Ser Val Glu
 230 235 240
 tct ttg gat gca agc gtc cag gct agc cct cca caa cag aaa gat gag 1125
 Ser Leu Asp Ala Ser Val Gln Ala Ser Pro Pro Gln Gln Lys Asp Glu
 245 250 255
 gag act gag aga agt gca aag gaa ctt gga aag tgt gac tgt tgt tca 1173
 Glu Thr Glu Arg Ser Ala Lys Glu Leu Gly Lys Cys Asp Cys Cys Ser
 260 265 270 275
 gat gat cag gct ccg cag cat ggg tgt aat cac aag ctg gaa tta gct 1221
 Asp Asp Gln Ala Pro Gln His Gly Cys Asn His Lys Leu Glu Leu Ala
 280 285 290
 ctt agc atg att aaa ggt ctt gat tat aag ccc atc cag agc ccc cga 1269
 Leu Ser Met Ile Lys Gly Leu Asp Tyr Lys Pro Ile Gln Ser Pro Arg

295	300	305	
ggg agc agg ctt ccg att cca gtg aaa tcc agc cta cct gga gcc aag	1317		
Gly Ser Arg Leu Pro Ile Pro Val Lys Ser Ser Leu Pro Gly Ala Lys			
310	315	320	
cct ggc cct agc atg aca gat gga gtt agt tcc ggt ttc ctt aac agg	1365		
Pro Gly Pro Ser Met Thr Asp Gly Val Ser Ser Gly Phe Leu Asn Arg			
325	330	335	
tct ttg aaa ccc ctt tac aag aca cct gtg agt tat ccc ttg gag ctt	1413		
Ser Leu Lys Pro Leu Tyr Lys Thr Pro Val Ser Tyr Pro Leu Glu Leu			
340	345	350	355
tca gac ctg cag gag ctg tgg gat gat ctc tgt gaa gat tat ttg ccg	1461		
Ser Asp Leu Gln Glu Leu Trp Asp Asp Leu Cys Glu Asp Tyr Leu Pro			
360	365	370	
ctc cgg gtc cag ccc atg act gaa gag ttg ctg aaa caa caa aag ctg	1509		
Leu Arg Val Gln Pro Met Thr Glu Glu Leu Leu Lys Gln Gln Lys Leu			
375	380	385	
aat tca cat gag acc act ata act cag cag tct gta tct gat tcc cac	1557		
Asn Ser His Glu Thr Thr Ile Thr Gln Gln Ser Val Ser Asp Ser His			
390	395	400	
ttg gca gaa ctc cag gaa aaa atc cag caa aca gag gcc acc aac aag	1605		
Leu Ala Glu Leu Gln Glu Lys Ile Gln Gln Thr Glu Ala Thr Asn Lys			
405	410	415	
att ctt caa gag aaa ctt aat gaa atg agc tat gaa cta aag tgt gct	1653		
Ile Leu Gln Glu Lys Leu Asn Glu Met Ser Tyr Glu Leu Lys Cys Ala			
420	425	430	435
cag gag tcg tct caa aag caa gat ggt aca att cag aac ctc aag gaa	1701		
Gln Glu Ser Ser Gln Lys Gln Asp Gly Thr Ile Gln Asn Leu Lys Glu			
440	445	450	
act ctg aaa agc agg gaa cgt gag act gag gag ttg tac cag gta att	1749		
Thr Leu Lys Ser Arg Glu Arg Glu Thr Glu Glu Leu Tyr Gln Val Ile			
455	460	465	
gaa ggt caa aat gac aca atg gca aag ctt cga gaa atg ctg cac caa	1797		
Glu Gly Gln Asn Asp Thr Met Ala Lys Leu Arg Glu Met Leu His Gln			
470	475	480	
agc cag ctt gga caa ctt cac agc tca gag ggt act tct cca gct cag	1845		
Ser Gln Leu Gly Gln Leu His Ser Ser Glu Gly Thr Ser Pro Ala Gln			
485	490	495	
caa cag gta gct ctg ctt gat ctt cag agt gct tta ttc tgc agc caa	1893		
Gln Gln Val Ala Leu Leu Asp Leu Gln Ser Ala Leu Phe Cys Ser Gln			
500	505	510	515
ctt gaa ata cag aag ctc cag agg gtg gta cga cag aaa gag cgc caa	1941		
Leu Glu Ile Gln Lys Leu Gln Arg Val Val Arg Gln Lys Glu Arg Gln			
520	525	530	
ctg gct gat gcc aaa caa tgt gtg caa ttt gta gag gct gca gca cac	1989		
Leu Ala Asp Ala Lys Gln Cys Val Gln Phe Val Glu Ala Ala Ala His			
535	540	545	
gag agt gaa cag cag aaa gag gct tct tgg aaa cat aac cag gaa ttg	2037		
Glu Ser Glu Gln Gln Lys Glu Ala Ser Trp Lys His Asn Gln Glu Leu			
550	555	560	

cga aaa gcc ttg cag cag cta caa gaa gaa ttg cag aat aag agc caa	2085
Arg Lys Ala Leu Gln Gln Leu Gln Glu Glu Leu Gln Asn Lys Ser Gln	
565 570 575	
cag ctt cgt gcc tgg gag gct gaa aaa tac aat gag att cga acc cag	2133
Gln Leu Arg Ala Trp Glu Ala Glu Lys Tyr Asn Glu Ile Arg Thr Gln	
580 585 590 595	
gaa caa aac atc cag cac cta aac cat agt ctg agt cac aag gag cag	2181
Glu Gln Asn Ile Gln His Leu Asn His Ser Leu Ser His Lys Glu Gln	
600 605 610	
ttg ctt cag gaa ttt cgg gag ctc cta cag tat cga gat aac tca gac	2229
Leu Leu Gln Glu Phe Arg Glu Leu Leu Gln Tyr Arg Asp Asn Ser Asp	
615 620 625	
aaa acc ctt gaa gca aat gaa atg ttg ctt gag aaa ctt cgc cag cga	2277
Lys Thr Leu Glu Ala Asn Glu Met Leu Leu Glu Lys Leu Arg Gln Arg	
630 635 640	
ata cat gat aaa gct gtt gct ctg gag cgg gct ata gat gaa aaa ttc	2325
Ile His Asp Lys Ala Val Ala Leu Glu Arg Ala Ile Asp Glu Lys Phe	
645 650 655	
tct gct cta gaa gag aaa gaa aaa gaa ctg cgc cag ctt cgt ctt gct	2373
Ser Ala Leu Glu Glu Lys Glu Lys Glu Leu Arg Gln Leu Arg Leu Ala	
660 665 670 675	
gtg aga gag cga gat cat gac tta gag aga ctg cgc gat gtc ctc tcc	2421
Val Arg Glu Arg Asp His Asp Leu Glu Arg Leu Arg Asp Val Leu Ser	
680 685 690	
tcc aat gaa gct act atg caa agt atg gag agt ctc ctg agg gcc aaa	2469
Ser Asn Glu Ala Thr Met Gln Ser Met Glu Ser Leu Leu Arg Ala Lys	
695 700 705	
ggc ctg gaa gtg gaa cag tta tct act acc tgt caa aac ctc cag tgg	2517
Gly Leu Glu Val Glu Gln Leu Ser Thr Thr Cys Gln Asn Leu Gln Trp	
710 715 720	
ctg aaa gaa gaa atg gaa acc aaa ttt agc cgt tgg cag aag gaa caa	2565
Leu Lys Glu Glu Met Glu Thr Lys Phe Ser Arg Trp Gln Lys Glu Gln	
725 730 735	
gag agt atc att cag cag tta cag acg tct ctt cat gat agg aac aaa	2613
Glu Ser Ile Ile Gln Gln Leu Gln Thr Ser Leu His Asp Arg Asn Lys	
740 745 750 755	
gaa gtg gag gat ctt agt gca aca ctg ctc tgc aaa ctt gga cca ggg	2661
Glu Val Glu Asp Leu Ser Ala Thr Leu Leu Cys Lys Leu Gly Pro Gly	
760 765 770	
cag agt gag ata gca gag gag ctg tgc cag cgt cta cag cga aag gaa	2709
Gln Ser Glu Ile Ala Glu Glu Leu Cys Gln Arg Leu Gln Arg Lys Glu	
775 780 785	
agg atg ctg cag gac ctt cta agt gat cga aat aaa caa gtg ctg gaa	2757
Arg Met Leu Gln Asp Leu Leu Ser Asp Arg Asn Lys Gln Val Leu Glu	
790 795 800	
cat gaa atg gag att caa ggc ctg ctt cag tct gtg agc acc agg gag	2805
His Glu Met Glu Ile Gln Gly Leu Leu Gln Ser Val Ser Thr Arg Glu	
805 810 815	
cag gaa agc caa gct gct gca gag aag ttg gtg caa gcc tta atg gaa	2853
Gln Glu Ser Gln Ala Ala Ala Glu Lys Leu Val Gln Ala Leu Met Glu	

820 825 830 835
 aga aat tca gaa tta cag gcc ctg cgc caa tat tta gga ggg aga gac 2901
 Arg Asn Ser Glu Leu Gln Ala Leu Arg Gln Tyr Leu Gly Gly Arg Asp
 840 845 850
 tcc ctg atg tcc caa gca ccc atc tct aac caa caa gct gaa gtt acc 2949
 Ser Leu Met Ser Gln Ala Pro Ile Ser Asn Gln Gln Ala Glu Val Thr
 855 860 865
 ccc act ggc cgt ctt gga aaa cag act gat caa ggt tca atg cag ata 2997
 Pro Thr Gly Arg Leu Gly Lys Gln Thr Asp Gln Gly Ser Met Gln Ile
 870 875 880
 cct tcc aga gat gat agc act tca ttg act gcc aaa gag gat gtc agc 3045
 Pro Ser Arg Asp Asp Ser Thr Ser Leu Thr Ala Lys Glu Asp Val Ser
 885 890 895
 ata ccc aga tcc aca tta gga gac ttg gac aca gtt gca ggg ctg gaa 3093
 Ile Pro Arg Ser Thr Leu Gly Asp Leu Asp Thr Val Ala Gly Leu Glu
 900 905 910 915

 aaa gaa ctg agt aat gcc aaa ggg aac ttg aac tca tgg cta aaa aag 3141
 Lys Glu Leu Ser Asn Ala Lys Gly Asn Leu Asn Ser Trp Leu Lys Lys
 920 925 930
 aaa gag aaa gtc aga tgg aac ttt ctg ctc tac agt cca tga 3183
 Lys Glu Lys Val Arg Trp Asn Phe Leu Leu Tyr Ser Pro
 935 940 945
 tggctgtgca ggaagaagag ctgcaggtgc aggctgctga tatggagtct ctgaccagga 3243
 acatacagat taaagaagat ctcataaagg acctgcaaat gcaactggtt gatcctgaag 3303
 acataccagc tatggaacgc ctgaccagc aagtcttact tcttcgggaa aaagttgctt 3363
 cagtagaatc ccagggtcaa gaaatttcag gaaaccgaag acaacagttg ctgctgatgc 3423
 tagaaggact agtagatgaa cggagtcggc tcaatgaggc cttacaagca gagagacagc 3483
 tctatagcag tctgtgaag ttccatgccc atccagagag ctctgagaga gaccgaactc 3543
 tgcaggtgga actggaaggg gtcaggtgt tacgcagtcg gctagaagaa gttcttgga 3603
 gaagcttga gcgcttaaac agcctggaga ccctggccgc cattggaggt ggggaactgg 3663
 aaagtgtcgc aattcatcac aagcatgcct actgagcact ggcgggtcag actgcagccc 3723
 aggatgaaa accctgtttg cactaaccag aaagatcctt gtctgatttt ggcagaatta 3783
 aacggtgact tactaatgat agaactggta caagtagcat caactacaaa gtgaaactca 3843
 ctttagccta catggatctc actgtacata catatcaatc cctaaattga atgggtggagg 3903
 ttgcaaagtg tatgtgcaca ttttaaatca ttctgtttta gtttttccac ttttattcat 3963
 tcttatccct agccccctct cgttccctca tcccttctgt gggccaataa agtttattct 4023
 tccccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 4049
 <;210>; 6
 <;211>; 944
 <;212>; PRT
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 6
 Met Lys Glu Ile Cys Arg Ile Cys Ala Arg Glu Leu Cys Gly Asn Gln
 1 5 10 15
 Arg Arg Trp Ile Phe His Thr Ala Ser Lys Leu Asn Leu Gln Val Leu
 20 25 30
 Leu Ser His Val Leu Gly Lys Asp Val Pro Arg Asp Gly Lys Ala Glu
 35 40 45
 Phe Ala Cys Ser Lys Cys Ala Phe Met Leu Asp Arg Ile Tyr Arg Phe

50	55	60
Asp Thr Val Ile Ala Arg Ile Glu Ala Leu Ser Ile Glu Arg Leu Gln		
65	70	75
Lys Leu Leu Leu Glu Lys Asp Arg Leu Lys Phe Cys Ile Ala Ser Met		
85	90	95
Tyr Arg Lys Asn Asn Asp Asp Ser Gly Ala Glu Ile Lys Ala Gly Asn		
100	105	110
Gly Thr Val Asp Met Ser Val Leu Pro Asp Ala Arg Tyr Ser Ala Leu		
115	120	125
Leu Gln Glu Asp Phe Ala Tyr Ser Gly Phe Glu Cys Trp Val Glu Asn		
130	135	140
Glu Asp Gln Ile Gln Glu Pro His Ser Cys His Gly Ser Glu Gly Pro		
145	150	155
Gly Asn Arg Pro Arg Arg Cys Arg Gly Cys Ala Ala Leu Arg Val Ala		
165	170	175
Asp Ser Asp Tyr Glu Ala Ile Cys Lys Val Pro Arg Lys Val Ala Arg		
180	185	190
Ser Ile Ser Cys Gly Pro Ser Ser Arg Trp Ser Thr Ser Ile Cys Thr		
195	200	205
Glu Glu Pro Ala Leu Ser Glu Val Gly Pro Pro Asp Leu Ala Ser Thr		
210	215	220
Lys Val Pro Pro Asp Gly Glu Ser Met Glu Glu Glu Thr Pro Gly Ser		
225	230	235
Ser Val Glu Ser Leu Asp Ala Ser Val Gln Ala Ser Pro Pro Gln Gln		
245	250	255
Lys Asp Glu Glu Thr Glu Arg Ser Ala Lys Glu Leu Gly Lys Cys Asp		
260	265	270
Cys Cys Ser Asp Asp Gln Ala Pro Gln His Gly Cys Asn His Lys Leu		
275	280	285
Glu Leu Ala Leu Ser Met Ile Lys Gly Leu Asp Tyr Lys Pro Ile Gln		
290	295	300
Ser Pro Arg Gly Ser Arg Leu Pro Ile Pro Val Lys Ser Ser Leu Pro		
305	310	315
Gly Ala Lys Pro Gly Pro Ser Met Thr Asp Gly Val Ser Ser Gly Phe		
325	330	335
Leu Asn Arg Ser Leu Lys Pro Leu Tyr Lys Thr Pro Val Ser Tyr Pro		
340	345	350
Leu Glu Leu Ser Asp Leu Gln Glu Leu Trp Asp Asp Leu Cys Glu Asp		
355	360	365
Tyr Leu Pro Leu Arg Val Gln Pro Met Thr Glu Glu Leu Leu Lys Gln		
370	375	380
Gln Lys Leu Asn Ser His Glu Thr Thr Ile Thr Gln Gln Ser Val Ser		
385	390	395
Asp Ser His Leu Ala Glu Leu Gln Glu Lys Ile Gln Gln Thr Glu Ala		
405	410	415
Thr Asn Lys Ile Leu Gln Glu Lys Leu Asn Glu Met Ser Tyr Glu Leu		
420	425	430
Lys Cys Ala Gln Glu Ser Ser Gln Lys Gln Asp Gly Thr Ile Gln Asn		
435	440	445

Leu Lys Glu Thr Leu Lys Ser Arg Glu Arg Glu Thr Glu Glu Leu Tyr
 450 455 460
 Gln Val Ile Glu Gly Gln Asn Asp Thr Met Ala Lys Leu Arg Glu Met
 465 470 475 480
 Leu His Gln Ser Gln Leu Gly Gln Leu His Ser Ser Glu Gly Thr Ser
 485 490 495
 Pro Ala Gln Gln Gln Val Ala Leu Leu Asp Leu Gln Ser Ala Leu Phe
 500 505 510
 Cys Ser Gln Leu Glu Ile Gln Lys Leu Gln Arg Val Val Arg Gln Lys
 515 520 525
 Glu Arg Gln Leu Ala Asp Ala Lys Gln Cys Val Gln Phe Val Glu Ala
 530 535 540
 Ala Ala His Glu Ser Glu Gln Gln Lys Glu Ala Ser Trp Lys His Asn
 545 550 555 560
 Gln Glu Leu Arg Lys Ala Leu Gln Gln Leu Gln Glu Glu Leu Gln Asn
 565 570 575
 Lys Ser Gln Gln Leu Arg Ala Trp Glu Ala Glu Lys Tyr Asn Glu Ile
 580 585 590
 Arg Thr Gln Glu Gln Asn Ile Gln His Leu Asn His Ser Leu Ser His
 595 600 605
 Lys Glu Gln Leu Leu Gln Glu Phe Arg Glu Leu Leu Gln Tyr Arg Asp
 610 615 620
 Asn Ser Asp Lys Thr Leu Glu Ala Asn Glu Met Leu Leu Glu Lys Leu
 625 630 635 640
 Arg Gln Arg Ile His Asp Lys Ala Val Ala Leu Glu Arg Ala Ile Asp
 645 650 655
 Glu Lys Phe Ser Ala Leu Glu Glu Lys Glu Lys Glu Leu Arg Gln Leu
 660 665 670
 Arg Leu Ala Val Arg Glu Arg Asp His Asp Leu Glu Arg Leu Arg Asp
 675 680 685

 Val Leu Ser Ser Asn Glu Ala Thr Met Gln Ser Met Glu Ser Leu Leu
 690 695 700
 Arg Ala Lys Gly Leu Glu Val Glu Gln Leu Ser Thr Thr Cys Gln Asn
 705 710 715 720
 Leu Gln Trp Leu Lys Glu Glu Met Glu Thr Lys Phe Ser Arg Trp Gln
 725 730 735

 Lys Glu Gln Glu Ser Ile Ile Gln Gln Leu Gln Thr Ser Leu His Asp
 740 745 750
 Arg Asn Lys Glu Val Glu Asp Leu Ser Ala Thr Leu Leu Cys Lys Leu
 755 760 765
 Gly Pro Gly Gln Ser Glu Ile Ala Glu Glu Leu Cys Gln Arg Leu Gln
 770 775 780
 Arg Lys Glu Arg Met Leu Gln Asp Leu Leu Ser Asp Arg Asn Lys Gln
 785 790 795 800
 Val Leu Glu His Glu Met Glu Ile Gln Gly Leu Leu Gln Ser Val Ser
 805 810 815
 Thr Arg Glu Gln Glu Ser Gln Ala Ala Ala Glu Lys Leu Val Gln Ala
 820 825 830

Leu Met Glu Arg Asn Ser Glu Leu Gln Ala Leu Arg Gln Tyr Leu Gly
 835 840 845
 Gly Arg Asp Ser Leu Met Ser Gln Ala Pro Ile Ser Asn Gln Gln Ala
 850 855 860
 Glu Val Thr Pro Thr Gly Arg Leu Gly Lys Gln Thr Asp Gln Gly Ser
 865 870 875 880
 Met Gln Ile Pro Ser Arg Asp Asp Ser Thr Ser Leu Thr Ala Lys Glu
 885 890 895
 Asp Val Ser Ile Pro Arg Ser Thr Leu Gly Asp Leu Asp Thr Val Ala
 900 905 910
 Gly Leu Glu Lys Glu Leu Ser Asn Ala Lys Gly Asn Leu Asn Ser Trp
 915 920 925
 Leu Lys Lys Lys Glu Lys Val Arg Trp Asn Phe Leu Leu Tyr Ser Pro
 930 935 940

<;210>; 7

<;211>; 10

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;221>; primer_bind

<;222>; (1)..(10)

<;220>;

<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence

<;400>; 7

tggtaaaggg

10

<;210>; 8

<;211>; 10

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence

<;220>;

<;221>; primer_bind

<;222>; (1)..(10)

<;400>; 8

gcatcgtcta

10

<;210>; 9

<;211>; 10

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence

<;220>;

<;221>; primer_bind

<;222>; (1)..(10)

<;400>; 9

actcgaccag

10

<;210>; 10

<;211>; 250

<;212>; DNA

```

<;213>; Homo sapiens
<;220>;
<;221>; gene
<;222>; (1).. (250)
<;400>; 10
tggtaaaggg cataacctg tacaacaaag ctgtgtgggc gcctgagccc tgcactacct 60
gcctctgtctc agatggaaga gttctttgtg atgaaacctat gtgccatccc cagagggtgcc 120
cccaaacagt tatacctgaa ggggaatgct gcccggtctg ctccgctact gtctcctatt 180
ctctactcag tggtagca ttaaatgata gaaatgaatt ttctggatg tccccaaaaa 240
aaaaaaaaaac 250

<;210>; 11
<;211>; 230
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;220>;
<;221>; gene
<;222>; (1).. (230)
<;400>; 11
gcatcgtcta ttgtaaga agaaaaagat aatgactccc tgttctgttc acaggacccc 60
catatctctt tccagacct tttgcattc caaggaaaaa tgggttggtc tgggactggg 120
agagaagga agtacacca tctgattgt ttttaattcc ttccggtttt ctatcaatgt 180
tacagttttt ttaataaag caagttattc attcaaaaaa aaaaaaaaaaac 230

<;210>; 12
<;211>; 764
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;220>;
<;221>; gene
<;222>; (1).. (764)
<;400>; 12
actcgaccag cattgcact gaagaaccag cgttgtctga ggttgggcca cccgacttag 60
caagcacaaa ggtaccccca gatggagaaa gcatggagga agagacgcct ggttcctctg 120
tggaatcttt ggatgcaagc gtccaggcta gccctccaca acagaaagat gaggagactg 180
agagaagtgc aaaggaactt ggaagtgtg actgttgttc agatgatcag gctccgcagc 240
atgggtgtaa tcacaagctg gaattagctc ttagcatgat taaaggtctt gattataagc 300
ccatccagag ccccgaggg agcaggcttc cgattccagt gaaatccagc ctacctggag 360
ccaagcctgg ccctagcatg acagatggag ttagttccgg ttctcttaac aggtctttga 420
aacccttta caagacacct gtgagttatc cttggagct ttcagacctg caggagctgt 480
gggatgatct ctgtgaagat tatttgccgc tccgggtcca gcccatgact gaagagttgc 540
tgaacaaca aaagctgaat tcacatgaga ccactataac tcagcagtct gtatctgatt 600
cccacttgc agaactccag gaaaaaatcc agcaaacaga ggccaccaac aagattcttc 660
aagagaaact taatgaaatg agctatgaac taaagtgtgc tcaggagtcg tctcaaaagc 720
aagatggtac aattcagaac ctcaagtcaa aaaaaaaaaa aaac 764

<;210>; 13
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;

```



```

<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (18)
<;400>; 13
gttttttttt ttttttag 18
<;210>; 14
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (18)
<;400>; 14
gttttttttt ttttttgg 18
<;210>; 15
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (18)
<;400>; 15
gttttttttt ttttttcg 18
<;210>; 16
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (18)
<;400>; 16
gttttttttt ttttttat 18
<;210>; 17
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1).. (18)
<;400>; 17
gttttttttt ttttttgt 18
<;210>; 18
<;211>; 18

```

```

<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(18)
<;400>; 18
gttttttttt ttttttct 18
<;210>; 19
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(18)
<;400>; 19
gttttttttt ttttttaa 18
<;210>; 20
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(18)
<;400>; 20
gttttttttt ttttttga 18

<;210>; 21
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(18)
<;400>; 21
gttttttttt ttttttca 18
<;210>; 22
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;

```

```

<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(18)
<;400>; 22
gttttttttt ttttttac
<;210>; 23
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(18)
<;400>; 23
gttttttttt ttttttgc
<;210>; 24
<;211>; 18
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Artificially synthesized arbitrary primer sequence
<;220>;
<;221>; primer_bind
<;222>; (1)..(18)
<;400>; 24
gttttttttt ttttttcc

```

【0126】

【図面の簡単な説明】

【図1】ノーザンブロッティングによる、種々ヒト組織でのヒトAG1102タンパクのmRNAの発現状態を示す写真である。

【図2】ノーザンブロッティングによる、種々ヒト組織でのヒトAA3901タンパクのmRNAの発現状態を示す写真である。

【図3】ノーザンブロッティングによる、種々ヒト組織でのヒトAA3401タンパクのmRNAの発現状態を示す写真である。

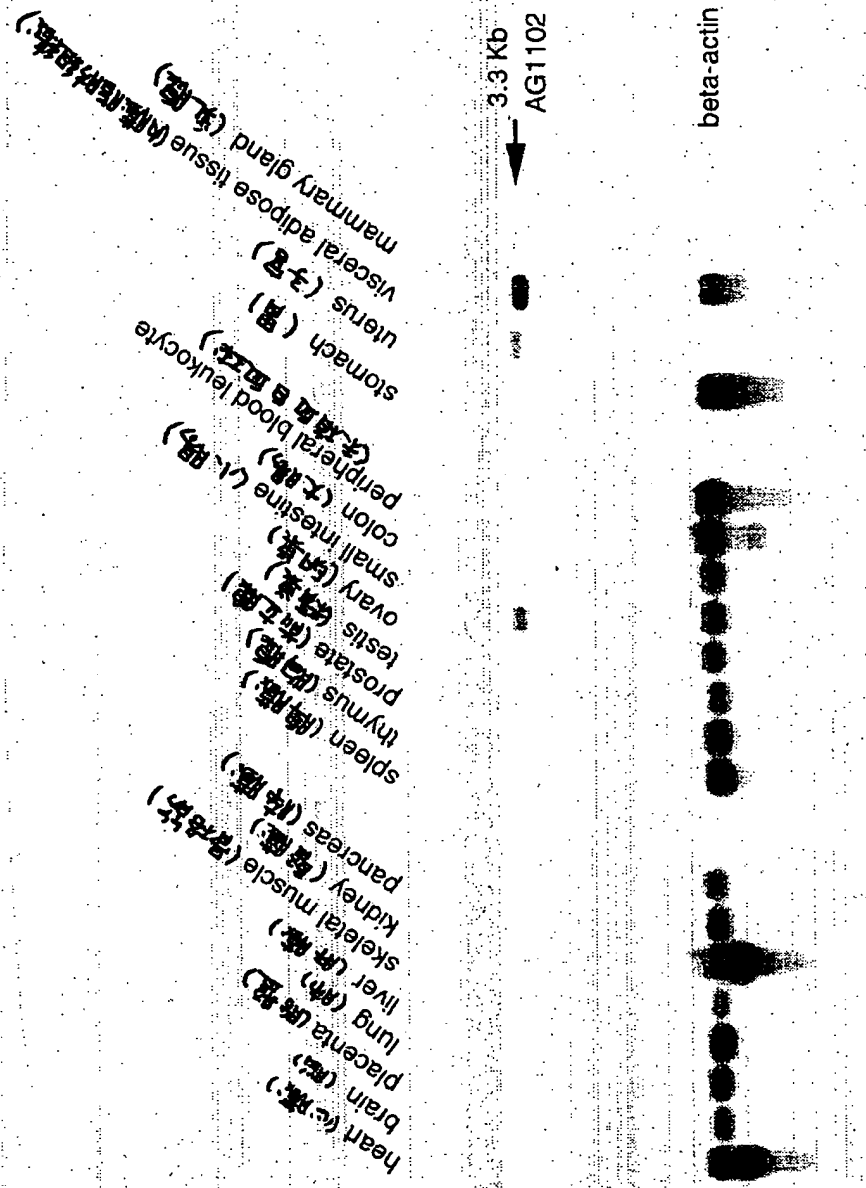
【図4】ヒトAG1102タンパクを構成するアミノ酸配列の一次構造的特徴を模式的に示す図。アミノ酸下段の記号（一、●、#及び*）は、各々、シグナル配列（一）、RGD配列（●）、フォンビルブランド因子C様ドメイン（#）、及びロイシンリッチリピート構造（*）の推定位置を示す。

【図5】図5(a)は、FISH法により分析した、ヒトAG1102遺伝子のヒト染色体上の位置を示す図。なお、矢印の先の2つの白点（約0.3mm）部分が、ヒトAG1102遺伝子が存在する9q22.3部位を示す。図5(b)は、細胞分裂中期ヒト細胞の染色体のR分染核型上でのマッピングを示す図。

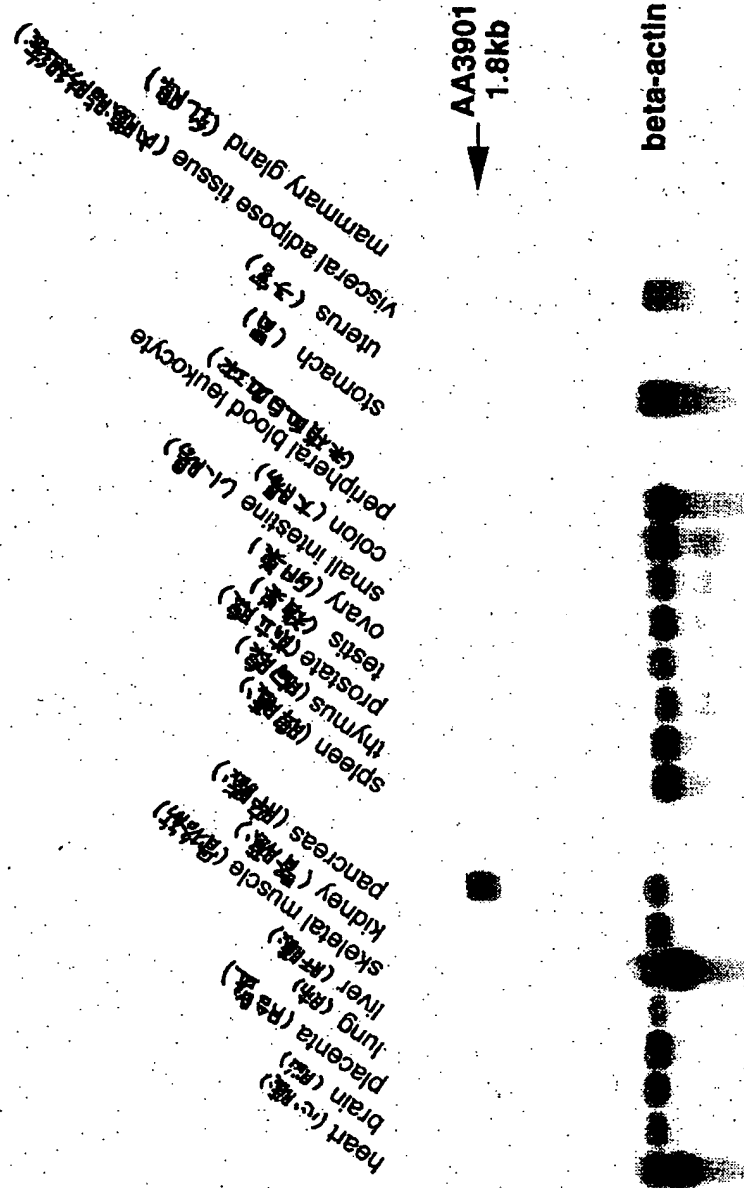
【図6】図6(a)は、FISH法により分析した、ヒトAA3901遺伝子のヒト染色体上の位置を示す図。なお、矢印の先の2つの白点（約0.3mm）部分が、ヒトAA3901遺伝子が存在する15q22部位を示す。図6(b)は、細胞分裂中期ヒト細胞の染色体のR分染核型上でのマッピングを示す図。

【図7】図7は、FISH法により分析した、ヒトAA3401遺伝子のヒト染色体上の位置を示す図。ヒトAA3401遺伝子は、1p12及び1q21.1部位のいずれか一方の部位に存在することが観察される。

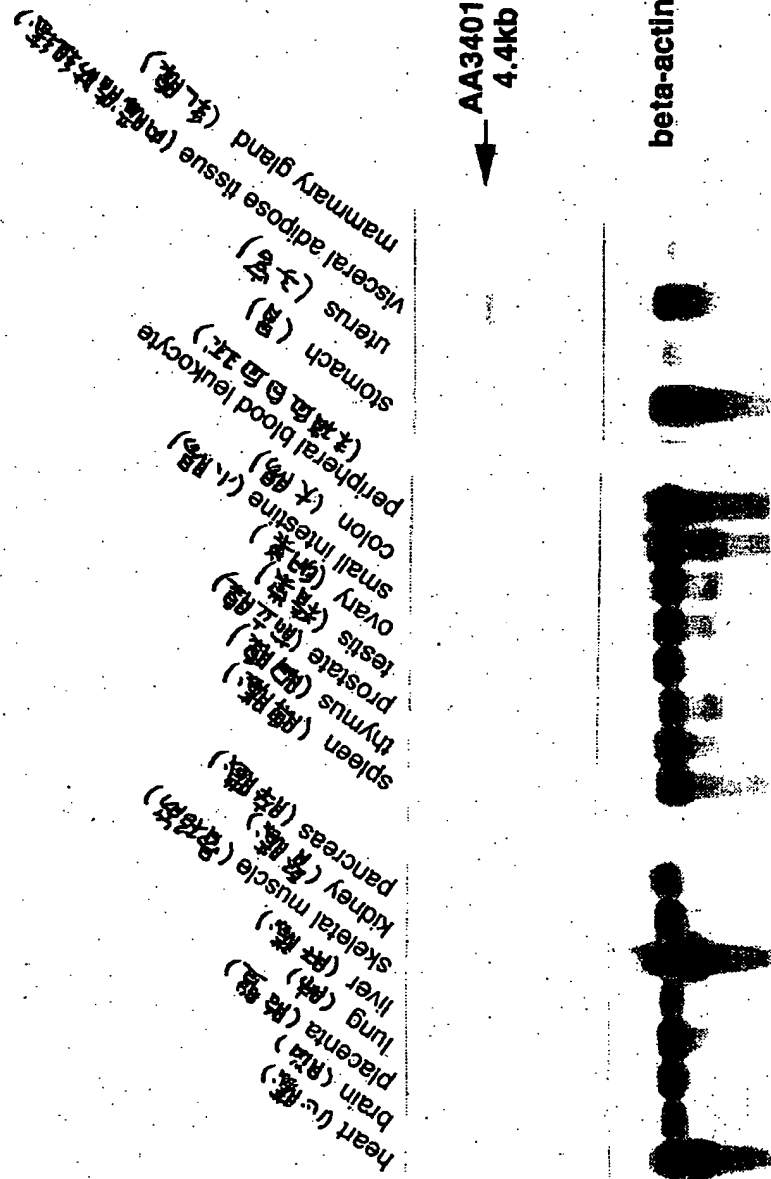
【図1】



【図2】



【図3】



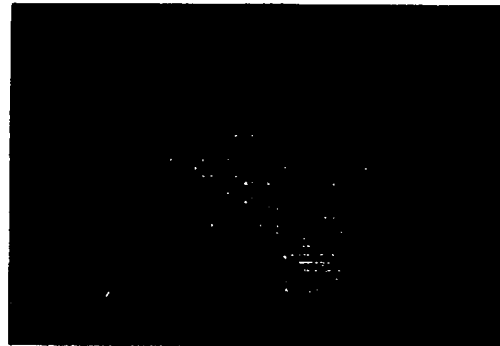
【図4】

```

1  MKIAMLCOFF  LLIIPTDIFG  KNEKIPKQR  KCIYHRRLK  SSISKHSN  50
51  RQLGIQITV  FIPVARLPIV  NEDYSMEKF  ESPSSFFGVE  SSYNLFGK  100
101 GHCUWKTIM  YKAVASPEP  CTICLOSQR  VLOEIMCHP  QRCQVILPE  150
      #####  #####  #####
151 GECPVCSNI  VSYLLSGIA  LNDNEFSQ  SSEQEPINL  LHRQLPPQV  200
      #####
201 GMDRIVRKA  LQSEDEEVK  EEDIEQRET  PESRQQQLY  SEGSRGGDR  250
251 RQRGGERRL  AHQQFQGRE  EDEDEEBC  EGEDEEBC  DEVRGIMFRM  300
      ***
301 PERSPLAPP  RGIURLPGC  SLSYRTTSC  NAMLIQIPL  TARQITSLE  350
      *****
351 TQNSTASID  EAPNLENLE  RLILSKNIU  SSGIGKAPK  LLKRLMRLM  400
      *****
401 DGNLIQIPS  QLPSTLESK  VNENLQAD  EESLSQNL  VILKEGNNL  450
      *****
451 SEANNPLAF  KPLKSLAYR  LKNKFRUP  QGLGSDIEL  YLENNQIBI  500
      *****
501 TRICPHIRK  INVIVLRNK  IENRIAPA  WINQENESI  DLSYKLYHV  550
      *****
551 PSYLPKSLH  LVLGNQER  IGVVFGME  RGLVLYLF  NKLADQMR  600
      *****
601 VSPYAYASL  RELFLHNL  KSTPPGTQM  KALHFLRNN  NKIRNLPEE  650
      *****
651 IONAPEIDG  NLEHLLEN  YIKREIPSY  TFSIRSYSS  IVLRQNIK  699
      *****

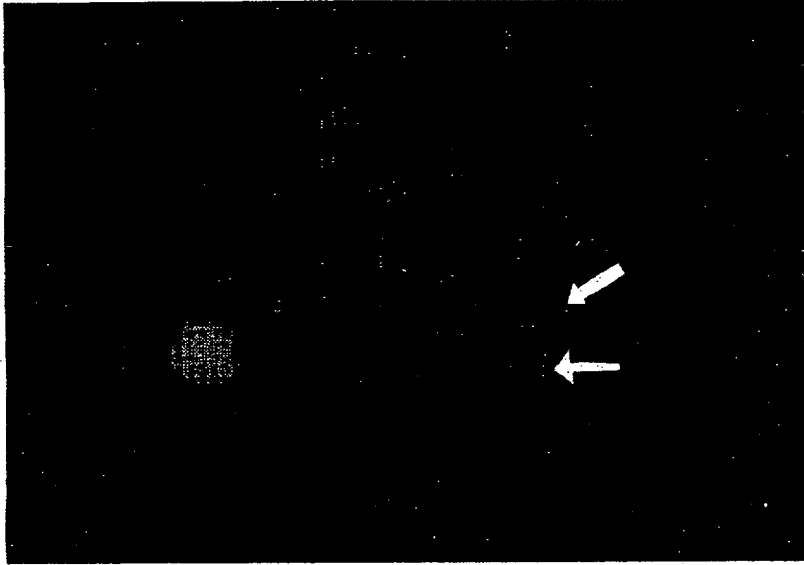
```

【図7】

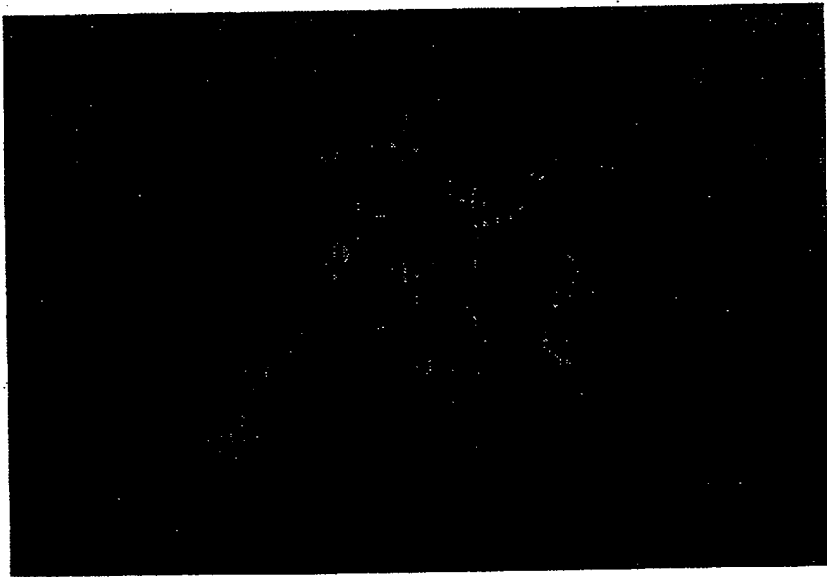


【図5】

(a)

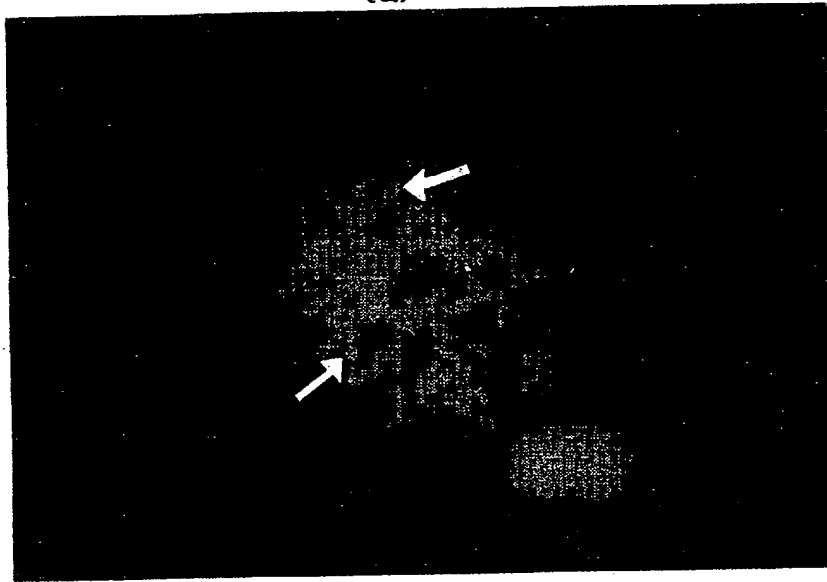


(b)

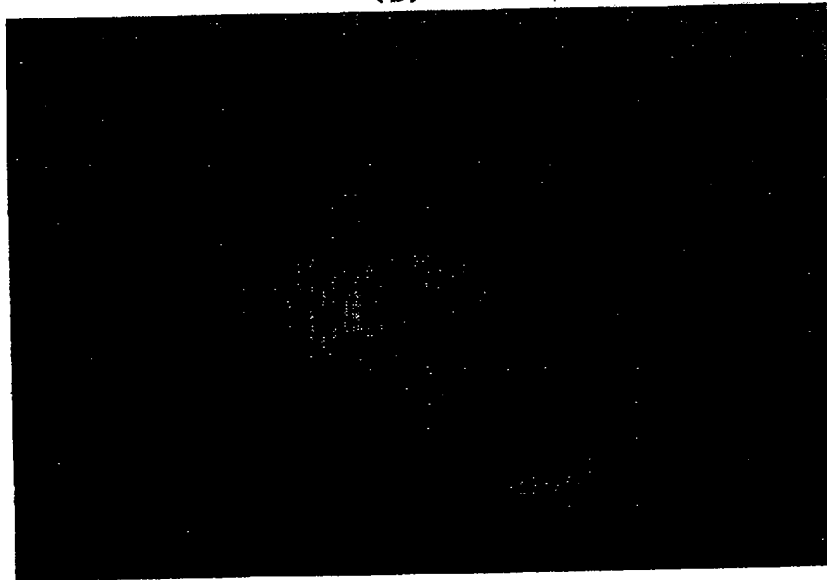


【図6】

(a)



(b)



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷

C 1 2 N 5/10
15/02

識別記号

F I

C 1 2 P 21/02
21/08

テーマコード (参考)

C

C 1 2 P 21/02
21/08
//(C 1 2 N 5/10
C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:91)

C 1 2 N 5/00
15/00

B
C

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA44 CA04 DA02
DA06 FA01 GA03 GA11 GA18
GA19 GA23 HA01
4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA19
CC24 CE04 CE06 CE11 CE12
CE14 DA06 DA07
4B065 AA26X AA90X AA91X AA92X
AA93Y AB01 AB05 AC14
AC15 BA01 BA25 CA24 CA25
CA44
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40
DA76 EA23 EA27 FA74 HA06

TISSUE-SPECIFIC BIOLOGICALLY ACTIVE PROTEIN DERIVED FROM MAMMAL

Patent Number: JP2000037190

Publication date: 2000-02-08

Inventor(s): NISHIU ATSUSHI;; NAKAMURA YUSUKE;; TANAKA TOSHIHIRO

Applicant(s): JAPAN TOBACCO INC

Requested Patent: ☐ JP2000037190Application
Number: JP19980225228 19980723Priority Number
(s):IPC Classification: C12N15/09; C07K14/47; C07K16/18; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/02;
C12P21/02; C12P21/08

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new DNA which codes for a tissue-specific biologically active protein derived from a mammal having a specific amino acid sequence or a part of it, is involved in the obesity and the appearance of complications accompanied with the 'internal organ'-type obesity, and can be used for treating and diagnosing these diseases.

SOLUTION: This is a new DNA which codes for a tissue-specific biologically active protein derived from a mammal having the amino acid sequence shown by the formula or a part of it, is produced by an adipocyte which constitutes an adipose tissue which is deeply related to an onset of obesity and/or the appearance of complications accompanied with the obesity, particularly the 'internal organ'-type obesity (e.g. diabetes, hyperlipidemia, hypertension, arteriosclerosis, hyperuricemia caused by excess synthesis of uric acid, and sleep apnea syndrome), and is used, for example, for the production of proteins which are useful, for example, for treating and diagnosing these diseases. This DNA is obtained by extracting mRNA from the internal organ adipose tissue abscised from a patient with stomach cancer, preparing a cDNA library from the obtained tissue by the conventional method, followed by screening the obtained library using a partial sequence of a gene derived from the human internal organ adipose tissue as a probe.

Data supplied from the esp@cenet database - I2